



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



DESDE 1962
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva

Julieta Dias Moreira da Silva

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Novembro 2020



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva

Julieta Dias Moreira da Silva

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadores:

Professor Doutor Paulo Paixão (NMS|FCM)

Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira (NMS|FCM)

Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas
(Unidade de Infeção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas)

Novembro 2020

Elementos Bibliográficos

Artigo publicado:

Julieta Silva^a, Cláudia Fernandes^a, Augusta Marques^a, Ana Teresa Maria^b, Cátia Correia^b, Madalena Lopo Tuna^b, Maria de Jesus Chasqueira^a, Paulo Paixão^a (2020). **Evaluation of saliva pools method for detection of congenital Human Cytomegalovirus infection.** *Journal of virological methods*. 275: 113759. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113759

a – Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), Nova Medical School| Faculdade de Ciências Médicas, Lisboa, Portugal

b – Unidade de Neonatologia do Serviço de Pediatria do Hospital de São Francisco Xavier – CHLO, Lisboa, Portugal.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu muito obrigada a toda a equipa do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas.

Ao Professor Doutor Paulo Paixão por desenvolver e orientar a dissertação, pelos conhecimentos transmitidos, todo o apoio, atenção, dedicação e disponibilidade durante o estudo.

À Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira pela sua coorientação neste projeto, pelo seu acompanhamento imprescindível durante todo o percurso, sua disponibilidade, a forma exigente, crítica e criativa que fez com que todo o estudo seguisse o melhor caminho, por todos os conselhos, sugestões. Todos estes aspetos foram essenciais para o desenvolvimento da minha dissertação.

Às minhas “co-coorientadoras”, Dr^a Augusta Marques e Dr^a Lucia Rodrigues, pela amabilidade, atenção, motivação, incentivo, boa disposição, por estarem sempre prontas a ajudar e todo o ensinamento das técnicas laboratoriais. A vossa paciência foi gigante, deram-me força para seguir sempre em frente e por me receberem sempre com um sorriso na cara. São sem dúvida as minhas mães de Lisboa, sempre me acolheram com amor e carinho.

Às minhas colegas de laboratório (Cláudia, Carla, Neuza e Sara) pela companhia. À Cláudia por todos os conhecimentos partilhados sobre o CMV e ajuda. À Neuza pela companhia, pelas noites e passeios, por me ouvir e aturar sempre que precisava.

À equipa da Unidade de Neonatologia e da Urgência, do Serviço de Pediatria, do Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental pela disponibilidade e tempo dispensado. Um obrigado em especial à Doutora Ana Teresa Maria por todo o apoio prestado.

Aos meus pais pelo esforço, apoio incondicional, paciência e por estarem sempre do meu lado nas minhas decisões, por acreditarem em mim e nunca duvidarem das minhas capacidades. Pelas palavras de força e incentivo quando mais precisava e quando a saudade era grande. Pelo amor e carinho que todos os dias me davam, apesar da distância. Não existem palavras suficientes para vos agradecer tudo o que fazem por mim diariamente. Amo-vos incondicionalmente!

E por fim, a todos aqueles que contribuíram para que a realização deste estudo fosse possível.

Obrigada!

Resumo

O vírus Citomegálico humano (HCMV) é o agente mais comum de infecção congénita, com uma prevalência de cerca de 0,2 a 2,2%, sendo uma causa de morbilidade e mortalidade perinatal. Cerca de 10-15% dos recém-nascidos vão apresentar sintomas ao nascimento e 5-15% dos assintomáticos à nascença vão desenvolver sequelas a longo prazo.

Nas últimas décadas tem vindo a ser debatida a implementação do rastreio universal. Este permitiria a identificação de crianças infetadas e a intervenção precoce. No entanto, não tem havido um consenso devido aos custos inerentes. De modo a contornar este problema, uma equipa portuguesa validou a metodologia de *pools* de urina, permitindo a redução de custos. Contudo, a colheita de urina apresenta desvantagens que impedem a sua aplicação num programa de rastreio.

Dado que a carga viral presente nas amostras de saliva é semelhante à da urina e a sua colheita é mais fácil e menos dispendiosa, o principal objetivo deste estudo foi validar a metodologia de *pools* de 10 amostras de salivas para o diagnóstico de infecção congénita por HCMV, utilizando as técnicas de PCR-RT e de *nested*-PCR. No presente estudo foram analisadas 226 amostras de saliva de recém-nascidos e crianças com idades entre um e três anos colhidas na Unidade de Neonatologia e na Urgência - Serviço de Pediatria do Hospital São Francisco Xavier, CHLO, entre o período de 8 de novembro de 2018 e 16 de maio de 2019.

Das 226 amostras de saliva individuais analisadas, 22 (9,7%) foram positivas na técnica de PCR-RT. Destas foram preparadas 22 *pools* de 10 e 22 *pools* de 20 amostras de saliva. Ambas as metodologias de *pools* apresentaram sensibilidade e especificidade idênticas no diagnóstico da infecção por HCMV, quando comparadas com a análise individual. A metodologia das *pools* de 10 e 20 amostras de saliva mostrou ser útil e permite uma redução de custos de 85% e 89%, respetivamente, no diagnóstico de infecção congénita por HCMV, quando comparada à análise individual das amostras de saliva.

Um total de 66 amostras foram testadas em ambas as técnicas de diagnóstico, PCR-RT e *nested*-PCR. Sessenta e três (98,4%) amostras tiveram resultados concordantes nas duas técnicas, estes dados permitem afirmar que os métodos não são estatisticamente diferentes e que existe uma boa concordância entre elas ($p = 0,500$; $k = 0,8167$), isto é, as duas técnicas apresentam a mesma capacidade para diagnosticar uma infecção congénita por HCMV em *pools* de saliva de recém-nascidos.

Os resultados sugerem que o diagnóstico de infecção congénita por HCMV através de amostras de saliva é viável, pois mostraram sensibilidade semelhante às amostras de urina. A técnica de PCR-RT demonstrou ser a mais indicada para este diagnóstico devido às vantagens que apresenta em comparação à *nested*-PCR.

A metodologia de *pools* de saliva permite uma redução de custos significativa, permitindo dessa forma a implementação de um rastreio universal em larga escala e consequentemente o diagnóstico de todos os recém-nascidos infetados congenitamente por HCMV e a intervenção precoce.

Palavras-chave: HCMV; Diagnóstico; Infecção congénita; Saliva; *Pools*

Abstract

The human cytomegalovirus (HCMV) is the most common agent of congenital infection, with prevalence between 0.2 and 2.2%, being a cause of perinatal morbidity and mortality. About 10-15% of newborns will show symptoms at birth and 5-15% of asymptomatic newborns will develop late sequelae.

In the last decades, the implementation of a universal screening has been debated. This would allow the identification of infected children and early intervention. However, there is a lack of consensus due to the inherent costs. In order to get around this problem, a Portuguese team validated the urine pool methodology, allowing for costs savings. However, the urine's collection has disadvantages that prevent its implementation of a screening program.

Since the viral load present in saliva samples is similar to the one we found in urine samples and its collection is easier and less expensive, the aim of this study was to validate the methodology of pools of 10 saliva samples for the diagnosis of congenital infection caused by HCMV, using the PCR-RT and Nested-PCR techniques.

In the present study, 226 saliva samples from newborns and children, aged between one and three years, were collected at the Neonatology and Urgency Unit of São Francisco Xavier's Hospital, between 8th of November 2018 and 16th of May 2019. From the 226 individual saliva samples analyzed, 22 (9.7%) were positive in the PCR-RT technique. From these, 22 pools of 10 and 22 pools of 20 saliva samples were prepared. Both pool methodologies showed identical sensitivity and specificity in the diagnosis of HCMV infection, when compared with the individual analysis. This pools methodology of 10 and 20 saliva samples proved to be useful and allow a cost reduction close to 85% and 89%, respectively, in the diagnosis of congenital infection caused by HCMV, when compared to individual analysis of saliva samples.

A total of 66 samples were tested in both diagnostic techniques. Sixty-three (98.4%) samples had concordant results in the two techniques, these data allow us to state that the methods aren't statistically different and that there's a good concordance between them ($p = 0.500$; $k = 0.8167$), this means, the two techniques have the same ability to diagnose a congenital infection caused by HCMV in newborn saliva pools.

The results suggest that the diagnosis of congenital infection caused by HCMV through saliva samples is viable, as it was showed similar sensitivity to urine samples. The PCR-RT technique proved to be the most suitable for this diagnosis due to the advantages it presents in comparison to nested-PCR technique.

The saliva pool methodology allows a significant cost reduction, thus allowing the implementation of a large-scale universal screening and, consequently, the diagnosis of all newborns infected congenitally by HCMV and also early intervention.

Key-words: HCMV; Diagnosis; Congenital infection; Saliva; Pools

Índice

Elementos Bibliográficos	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	x
Abreviaturas e Siglas.....	xi
1 Introdução	1
1.1 História	1
1.2 Taxonomia	2
1.3 Estrutura do HCMV.....	2
1.3.1 Genoma	2
1.3.2 Morfologia do vírus	3
1.4 Ciclo Replicativo.....	4
1.5 Epidemiologia e Prevalência.....	5
1.5.1 Prevalência Mundial	6
1.5.2 Prevalência em Portugal.....	7
1.6 Manifestações Clínicas	8
1.6.1 Manifestações Clínicas na mulher grávida	8
1.6.2 Manifestações clínicas no Feto e Recém-Nascido.....	8
1.7 Prevenção	9
1.7.1 Imunização Passiva	9
1.7.2 Imunização Ativa	10
1.7.3 Antivirais	12
1.7.4 Medidas de Higiene	12
1.8 Métodos de diagnóstico	14
1.8.1 Citologia e Histologia	14
1.8.2 Serologia	15

1.8.3	Cultura Celular	16
1.8.4	Antigenémia	17
1.8.5	Técnicas de PCR	19
1.9	Diagnóstico nos diferentes tipos de infeção	26
1.9.1	Diagnóstico na Mulher Grávida	26
1.9.2	Diagnóstico no feto.....	27
1.9.3	Diagnóstico no Recém-nascido.....	29
1.10	Rastreio.....	31
1.11	Tratamento.....	34
1.11.1	Tratamento na mulher grávida.....	34
1.11.2	Tratamento no Recém-nascido	35
1.12	Objetivos.....	37
2	Materiais e Métodos	39
2.1	Desenho de estudo.....	40
2.2	População em estudo	40
2.3	Amostras Biológicas.....	41
2.4	Processamento das amostras biológicas.....	41
2.5	Amostras <i>Spiking</i>	42
2.6	Extração de DNA.....	42
2.7	Técnicas de Biologia Molecular	43
2.7.1	PCR-RT	43
2.7.2	<i>Nested</i> -PCR	46
2.8	Limite de deteção das técnicas em estudo	48
2.9	Preparação das <i>pools</i> de saliva.....	49
2.10	Análise Estatística	49
3	Resultados e Discussão.....	51
3.1	População	51
3.2	Determinação do limite de deteção das técnicas utilizadas no estudo	51
3.2.1	Limite de deteção da técnica PCR-RT	52

3.2.2	Limite de detecção da técnica <i>nested</i> -PCR	52
3.3	Análise das amostras de <i>spiking</i> por PCR-RT.....	53
3.4	Análise das amostras <i>spinking</i> pela técnica <i>nested</i> -PCR	54
3.5	Análise qualitativa das amostras de saliva por PCR-RT	54
3.5.1	Análise qualitativa das amostras de urina por PCR-RT.....	55
3.5.2	Análise qualitativa das <i>pool</i> 10 e <i>pool</i> 20	56
3.6	Quantificação da carga viral das amostras positivas por PCR-RT.....	56
3.6.1	Quantificação da carga viral das salivas e <i>pools</i> positivas por PCR-RT.....	57
3.6.2	Quantificação da carga viral das amostras de urina positivas por PCR-RT	60
3.7	Análise das amostras de saliva e <i>pools</i> positivas pela técnica <i>nested</i> -PCR.....	60
3.8	Redução de custos associados à metodologia de <i>pools</i>	61
4	Conclusões.....	62
5	Referências Bibliográficas.....	64
6	Anexos	84
	Anexo I – Autorização da Comissão de Ética da NMS FCM – UNL (CEFCM) para a realização do estudo.	84
	Anexo II – Autorização da Comissão de Ética para a Saúde do CHLO para a realização do estudo.....	85
	Anexo III – Consentimento informado entregue aos representantes legais das crianças que participaram no estudo.....	87
	Anexo III – Consentimento informado entregue aos representantes legais das crianças que participaram no estudo - Continuação.	88
	Anexo IV – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente dos RN (Unidade de Neonatologia – Serviço de Pediatria - HSFx).....	89
	Anexo V – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente das CR (Urgência – Serviço de Pediatria - HSFx).	91
	Anexo VI – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente dos RN (Amostras armazenadas no laboratório).	93

Índice de Figuras

Figura 1. 1 - Árvore filogenética do Herpesvírus (Adaptado de ICTV, 2020).....	2
Figura 1. 2 - Estrutura do HCMV e componentes estruturais (Chaer et al., 2016).....	4
Figura 1. 3 - Ciclo Replicativo do HCMV (Beltran and Cristea, 2014).	5
Figura 1. 4 - Diagrama da resposta de anticorpos IgM e IgG após infecção primária ou recorrente por HCMV. A linha a tracejado representa os anticorpos IgG específicos para HCMV (Hodinka, 2010, pp. 133-150).	16
Figura 1. 5 - Método de Antigenémia, observação da coloração dos núcleos de leucócitos infectados por HCMV (técnica de imunofluorescência indireta) (Hodinka, 2015, pp. 1722-1723).....	19
Figura 1. 6 - Visualização dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose (Yilmaz et al., 2012, pp. 33).....	21
Figura 1. 7 - Princípio de funcionamento do SYBR Green (A) e das sondas TaqMan® (B) (Kim et al., 2013)..	23
Figura 1. 8 - Modelo apresentando as diferentes fases da curva de amplificação da PCR-RT (Arya et al., 2005).	24
Figura 1. 9 - Exemplo de uma curva padrão (PCR-RT). No eixo dos X estão representadas as concentrações em escala logarítmica do padrão e no eixo dos Y os valores de CT (Applied Biosystems, 2016, p.7).	25
Figura 2. 1 – Fluxograma do estudo.	40
Figura 2. 2 - Ciclo de amplificação da técnica PCR-RT.	45
Figura 2. 3 – Esquema das diluições efetuadas para determinar o limite de detecção em ambas as técnicas.	49
Figura 3. 1 - Distribuição da população inserida no estudo.	51

Índice de Tabelas

Tabela 2. 1 – Sequência dos <i>primers</i> e sonda utilizados na técnica PCR-RT.	43
Tabela 2. 2 - Mistura de reagentes por reação de amplificação da técnica PCR-RT.	44
Tabela 2. 3 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas duas reações na técnica <i>nested</i> -PCR.	46
Tabela 2. 4 - Mistura de reagentes por reação da 1ª amplificação da técnica <i>nested</i> -PCR.....	46
Tabela 2. 5 - Mistura de reagentes por reação da 2ª amplificação da técnica <i>nested</i> -PCR.....	47
Tabela 2. 6 - Interpretação dos valores de k (Landis and Koch, 1977).	50
Tabela 3. 1 - Resultados das diluições para determinar o limite de detecção da técnica PCR-RT.....	52
Tabela 3. 2 - Resultados das diluições para determinar o limite de detecção da técnica <i>nested</i> -PCR.....	53
Tabela 3. 3 - Resultados das 4 amostras SPK e respectivas <i>pool</i> /10 na técnica PCR-RT.	54
Tabela 3.4 - Resultados qualitativos das 4 amostras SPK e das respectivas <i>pool</i> /10 na técnica <i>nested</i> -PCR.....	54
Tabela 3.5 - Resultados obtidos através da técnica PCR-RT na análise individual das amostras de saliva.....	55
Tabela 3.6 – Resultados qualitativos das amostras de urina utilizando a técnica PCR-RT.....	55
Tabela 3.7 – Resultados qualitativos obtidos na técnica PCR-RT das amostras de saliva individuais, <i>pool</i> /10 e <i>pool</i> /20.	56
Tabela 3. 8 – Resultados obtidos nas técnicas PCR-RT quantitativa e <i>nested</i> -PCR de todas as amostras de saliva e respectivas <i>pool</i> /10 e <i>pool</i> /20.....	58
Tabela 3. 9 - Comparação das cargas virais obtidas nas amostras de saliva e urina positivas para HCMV por PCR-RT.	60
Tabela 3. 10 - Comparação dos resultados obtidos pela técnica <i>nested</i> -PCR e PCR-RT utilizadas no estudo.	61

Abreviaturas e Siglas

μL	Microlitro	mg	Miligramas
μM	Micromole	MgCl₂	Cloreto de Magnésio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	mL	Mililitro
CHLO	Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental	MPM	Marcador de Peso Molecular
CI	Controlo Interno	NIBSC	<i>National Institute for Biological Standard and Control</i>
CN	Controlo Negativo	NMS	<i>Nova Medical School</i>
CP	Controlo Positivo	°C	Grau Celsius
CPE	Efeito Citopático Característico	p	Proteína
CR	Criança	pb	Pares de Bases
CT	<i>Threshold Cycle</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid	PCR-RT	<i>Real Time PCR</i>
dNTPs	Deoxyribonucleotide Triphosphates	RM	Ressonância Magnética
EUA	Estados Unidos da América	RN	Recém-Nascido
FCM	Faculdade de Ciências Médicas	RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	SNC	Sistema Nervoso Central
g	Gramas	SPK	<i>Amostra Spinking</i>
G+C	Conteúdo em Guanina e Citosina	TA	Temperatura Ambiente
gB	Glicoproteína B	TD	Tese Diagnóstico
gp	Glicoproteína	Tris-HCL	Tris-Hidrocloreto
HCMV	Vírus Citomegálico Humano	U	Unidades
HIG	Imunoglobulina Humana	UI	Unidades Internacionais
IA	Índice de Aidez	UNL	Universidade Nova de Lisboa
IgG	Imunoglobulina de Classe G	UV	Ultravioleta
IgM	Imunoglobulina de Classe M	V	<i>Volts</i>
kg	Quilograma	W	<i>Watts</i>
LA	Líquido Amniótico	x g	Aceleração da Gravidade
mA	Miliampere		

1 Introdução

1.1 História

A história do HCMV iniciou-se em 1881, quando Ribbert observou “células grandes” em rins de nados mortos e na glândula parótida de crianças. Estes factos não foram valorizados até que em 1904, Jesionek e Kiolemenoglou observaram células semelhantes nos pulmões, rins e fígado de um feto de 8 meses. Estas células, descritas como “protozoan like”, continham um “corpo nuclear central”, cercado por um halo claro. Três anos depois, a equipa de Ribbert, observou novamente este tipo de células nas glândulas parótidas de quatro crianças num total de 30 observadas. Estes dois grupos de investigadores foram os primeiros a descrever a existência de células citomegálicas típicas com inclusões intracelulares (Ho, 2008).

Goodpasture e Talbot, em 1921 notaram que havia semelhanças entre as células anteriormente observadas por Ribbert e as encontradas em lesões da pele provocadas pela Varicela, sugerindo que o causador de tais inclusões seria um agente semelhante e não um protozoário. A introdução do termo *cytomegalia* serviu para enfatizar o notável aumento das células infetadas e distinguir de outras células também com alterações (Goodpasture and Talbot, 1921). Nesse mesmo ano, Lipsghuetz descobriu células semelhantes em lesões de um homem infetado por herpes *zoster* e herpes *genitalis* (Ho, 2008). No ano seguinte, Muller observou inclusões idênticas em nados mortos, o que indicava que teriam atravessado a barreira placentária, descartando assim a possibilidade de se tratar de um protozoário (Ho, 1991, p.2).

VonGlahn e Pappenheimer foram mais longe e relataram que as inclusões intracelulares poderiam ser causadas por um grupo específico de vírus, devido às semelhanças com as lesões causadas pelos vírus herpes *zoster* e herpes *genitalis*. Este vírus foi mais tarde designado como *herpesviridae* (VonGlahn and Pappenheimer, 1925; Ho, 2008).

Na década de 30, Farber e Wolbach relataram a presença de inclusões idênticas às anteriormente descritas em glândulas salivares de 26 crianças, com causas de morte diversas, num total de 183 crianças examinadas. Este estudo colocou a questão que se tratava de um agente relativamente frequente (Farber and Wolbach, 1932). Mais tarde, foram descritos 25 casos de infeção congénita letal rara, caracterizada por petéquias, hepatoesplenomegalia e calcificações intracerebrais, todos apresentando células com inclusões intracelulares típicas (Ho, 2008).

Em 1950, Wyatt e seus colaboradores, afirmaram que a falta de uniformidade na nomenclatura atrasou o conhecimento como entidade, sugerindo o termo Doença Generalizada de Inclusões Citomegálicas (do inglês *generalized cytomegalic inclusion disease - CID*) (Wyatt et al., 1950).

Em 1956, através da técnica de cultura celular, três laboratórios isolaram, em simultâneo o HCMV (Griffiths, 2009, p. 161). Margaret Smith foi capaz de isolar o vírus a partir da glândula salivar submandibular de um

nado morto de 7 meses e do rim de um lactente com um mês de idade, vítima de doença citomegálica (Smith, 1956). Weller e seus colaboradores conseguem visualizar inclusões intracelulares em amostras de urina e fígado de três crianças que apresentavam alterações citopáticas, acabando por isolar a estirpe *Davis* em culturas de fibroblastos humanos a partir de uma biopsia hepática de uma criança com três meses de idade (Weller et al., 1957). Outros achados foram ocorrendo, Rowe e a sua equipa observaram corpos de inclusão intracelulares a partir de culturas de tecidos adenóides de três crianças. A estirpe AD169 foi isolada através de culturas de tecido adenóide de uma criança do sexo feminino de 7 anos. Este estudo permitiu ainda mostrar que a seroprevalência para o HCMV, aumentava gradualmente com a idade (Rowe et al., 1956). Estes investigadores, três anos mais tarde, propuseram o nome de *Cytomegalovirus* (Weller et al., 1960).

1.2 Taxonomia

O Vírus Citomegálico (HCMV), segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), pertence à ordem *Herpesvirales*, à família *Herpesviridae*, à subfamília *Betaherpesvirinae* e ao género *Cytomegalovirus* (Figura 1.1). Quanto à espécie, é classificado como *Human betaherpesvirus 5*, sendo conhecido como *Human herpesvirus 5* (HHV-5) (ICTV, 2020). É considerado o maior vírus da sua família e morfologicamente indistinguível de outros herpesvírus humanos (Revello and Gerna, 2002).

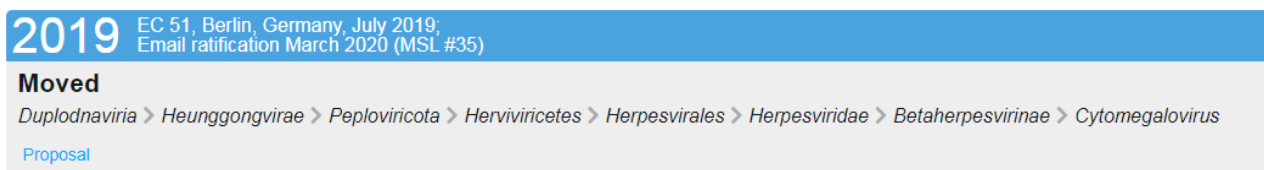


Figura 1.1 - Árvore filogenética do Herpesvírus (Adaptado de ICTV, 2020).

1.3 Estrutura do HCMV

1.3.1 Genoma

O genoma viral do HCMV consiste numa molécula de DNA linear em cadeia dupla (dsDNA) com aproximadamente 236 000 pb. É considerado o maior genoma da família *Herpesviridae*, contém um elevado conteúdo em G+C, cerca de 57% e detém capacidade para codificar, pelo menos, 167 proteínas (Mocarski et al., 2013, p. 1970). Encontra-se dividido em dois segmentos: o segmento de genoma longo (do inglês *long genome segment* – L) e o segmento de genoma curto (do inglês *short genome segment* - S). Cada um destes segmentos é constituído por uma região única central, a “longa” (do inglês *unique long region* – UL) e a “curta” (do inglês *unique short region* – US), estando ligadas por zonas de repetição de sequências terminais (TRL e TRS, do inglês *Terminal Repeats*) e por zonas internas na interação de segmentos longos e curtos (IRS e IRL, do inglês *Internal Repeats*). Assim sendo, o genoma tem a seguinte organização: TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS. Durante a replicação, as regiões US e UL podem estar orientadas em dois sentidos, permitindo a

formação de quatro isómeros equimolares (Mocarski et al., 2013, p. 1975; Ho, 2008; Pignatelli et al., 2004). Os genes deste vírus são designados e numerados consoante a sua posição no genoma, embora alguns tenham nomes descritivos adicionais como, *p* para proteína, *pp* para fosfoproteína e *gp* para glicoproteína. Por exemplo, UL54 é o 54º gene na região UL, trata-se do gene da DNA polimerase (Boeckh and Geballe, 2011; Paixão, 2009, pp. 13-14).

1.3.2 Morfologia do vírus

O genoma do HCMV está rodeado por uma cápside icosaédrica, constituída por 162 capsómeros, dos quais 150 são hexâmeros, 12 pentâmeros e 320 triplexes. A ligação entre os capsómeros é intercapsomérica, facilitada por complexos triplex e tem um diâmetro aproximado de 116nm (Butcher et al., 1998; Gibson et al., 1996). Na composição desta estrutura fazem parte quatro proteínas: a pUL46, a pUL48.5, a proteína *minor* da cápside (mCP) e a proteína *major* da cápside (MCP), codificadas pelos genes UL85 e UL86, respetivamente (Landolfo et al., 2003).

A cápside encontra-se circundada por um tegumento amorfo, que contém proteínas virais, desempenhando funções importantes ao longo de todo o processo, desde a infeção à replicação viral (Kalejta, 2008). Pode estar dividido em dois sub-compartimentos, o interno e o externo. No interno existem proteínas densamente compactadas ao redor da cápside e no externo, componentes livremente compactados no espaço entre o tegumento e o invólucro (Yu et al., 2011).

O tegumento encontra-se delimitado pelo invólucro. A camada mais externa do virião é constituída por uma bicamada lipídica, contém 6 glicoproteínas codificadas pelo vírus, a gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gp UL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM) e gpUL115 (gL) que desempenham funções essenciais na entrada do vírus na célula hospedeira, na interação célula-célula e na maturação do virião. O virião maduro tem um diâmetro que varia entre 150 a 200 nm (Britt and Mach, 1996; Landolfo et al., 2003).

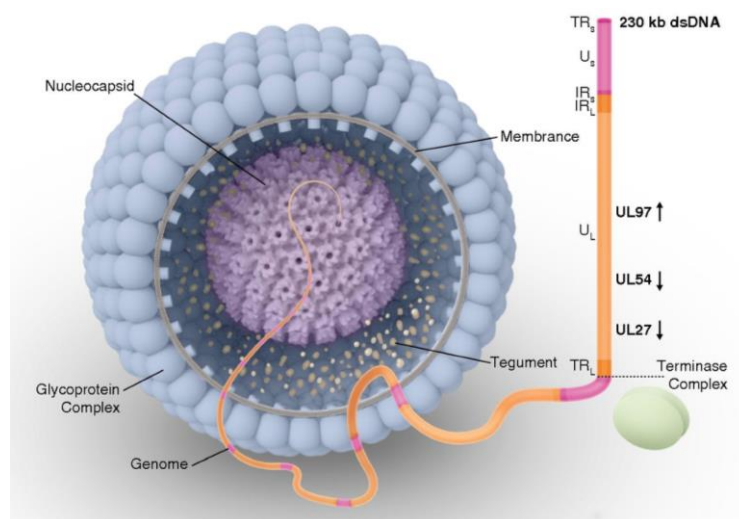


Figura 1.2 - Estrutura do HCMV e componentes estruturais (Chaer et al., 2016).

1.4 Ciclo Replicativo

O HCMV tem a capacidade de infectar uma grande variedade de células *in vivo*, tais como células endoteliais, epiteliais, musculares lisas, macrófagos e fibroblastos, enquanto *in vitro* é restrito, multiplicando-se apenas em fibroblastos (Sinzger et al., 1995). O HCMV é um vírus que tem um ciclo de vida relativamente longo em comparação com outros Herpesvírus (Revello and Gerna, 2004).

O ciclo replicativo do HCMV inicia-se com a interação das glicoproteínas virais específicas com os receptores celulares presentes na superfície da célula hospedeira, ocorrendo a ligação e posterior fusão do invólucro do vírus com a membrana celular, resultando na deposição de componentes do virião no citoplasma da célula (Figura 1.3 [A]). Uma vez no citoplasma, as proteínas da cápside e do tegumento fazem com que o vírus se dirija até ao núcleo, onde liberta o genoma, processo conhecido como *uncoating* (Compton and Feire, 2007, p. 231). Existem cápsides que se associam a microtúbulos da célula para facilitar a sua ida para o núcleo (Figura 1.3 [B]) (Ogawa-Goto et al., 2003).

Após a entrada do genoma no núcleo, este é transcrito, traduzido e replicado. A transcrição é dividida em 3 fases coordenadas e reguladas, a fase imediatamente precoce (do inglês *immediatly-early* - IE), fase precoce (do inglês *early* - E) e fase tardia (do inglês *late* - L). A fase imediatamente precoce consiste em genes que vão dar origem a proteínas imediatamente precoces (α), importantes para a regulação da transcrição e que servem como ativadoras dos genes precoces. Na fase precoce, os genes vão originar proteínas precoces (β), estas consistem em fatores de transcrição e enzimas, incluindo a DNA polimerase, estando envolvidas no processo de replicação do DNA viral. Por último, a fase tardia consiste em genes que são transcritos em abundância após o início da replicação, originando proteínas estruturais designadas de tardias (γ), estas fazem parte da cápside e do invólucro (Hodinka, 2015, p.1546; Fortunato et al., 2000).

Os procapsídeos migram para o núcleo, agrupam-se e são preenchidos com DNA replicado, processo conhecido por encapsidação (Figura 1.3 [C]). Atravessam a membrana nuclear e o retículo endoplasmático (ER), adquirindo proteínas do tegumento e mais tarde o invólucro no complexo de Golgi. Por fim, estas partículas infecciosas são libertadas para o espaço extracelular por exocitose ou lise celular, juntamente com partículas não infecciosas, designadas por corpos densos (Figura 1.3 [D]) (Hodinka, 2015, pp. 1718-1737; Beltran and Cristea, 2014).

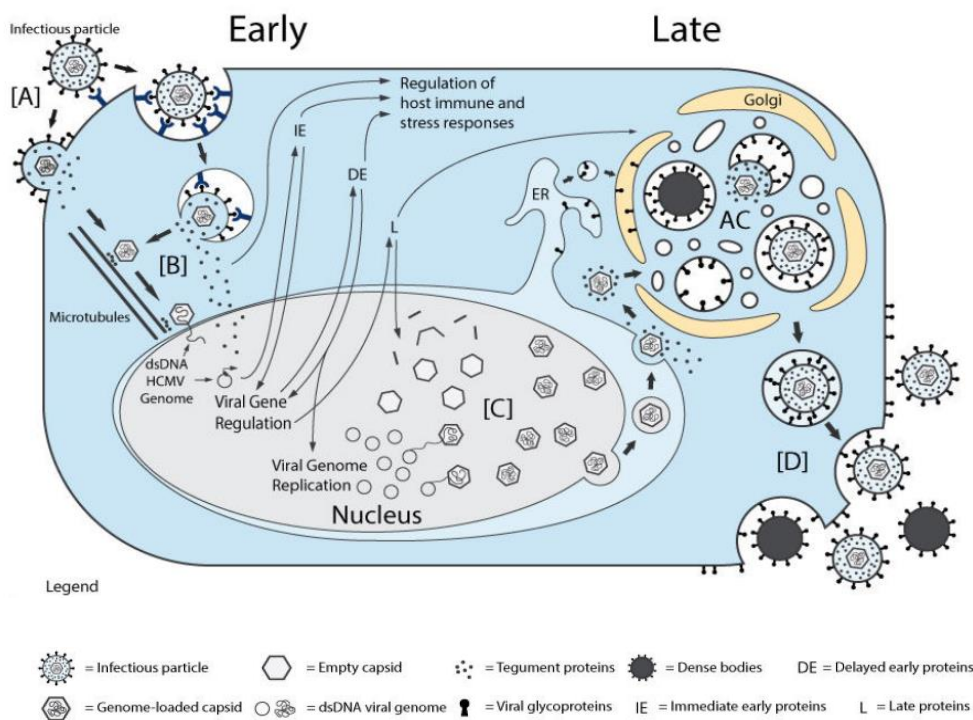


Figura 1.3 - Ciclo Replicativo do HCMV (Beltran and Cristea, 2014).

1.5 Epidemiologia e Prevalência

O reservatório do HCMV é o Homem, podendo ser infetado em qualquer idade. A transmissão inter-humana do vírus pode ocorrer de forma horizontal, através do contacto direto ou indireto com fluídos corporais, como urina, saliva, secreções orofaríngeas, cervicais e vaginais, esperma, leite materno, lágrimas, constituintes sanguíneos, transplante de órgãos e células, ou de forma vertical, transmissão do vírus da mãe para o filho (Lazzarotto, 2010; Britt, 2011, p. 706; Harari et al., 2004).

A transmissão vertical pode ser diferenciada consoante o momento de aquisição do vírus pelo feto ou recém-nascido. Quando a infeção é adquirida pelo feto ainda no útero, por via hematogénica transplacentar, durante a virémia materna, trata-se de uma infeção congénita ou pré-natal. Infeção perinatal ocorre após o contacto com secreções cervicais e vaginais infetadas, durante a passagem do feto pelo canal de parto ou após a exposição a fluidos corporais infetados, como leite materno ou saliva, durante o período neonatal (Kim, 2010).

A transmissão pode ocorrer através de uma infecção primária ou de uma infecção recorrente ou secundária. A infecção primária caracteriza-se pelo primeiro contacto do vírus com o hospedeiro (Varani and Landini, 2011). Após este tipo de infecção, o vírus tem a capacidade de permanecer latente no hospedeiro durante toda a vida, tal como acontece nos outros *Herpesvirus*. Isto significa que o genoma viral irá persistir em locais específicos do hospedeiro sem a produção de viriões infecciosos (Sinclair and Sissons, 2006). Uma infecção recorrente consiste na reativação do vírus causador da infecção primária ou na reinfeção por uma estirpe diferente daquela que infetou o hospedeiro anteriormente (Malm and Engman, 2007).

O HCMV pode ser excretado durante meses, após uma infecção congénita, perinatal ou pós-natal. Esta excreção persistente contribui para a disseminação do vírus em indivíduos suscetíveis, visto que pode causar uma infecção primária (Kano and Shiohara, 2000). Em indivíduos imunocompetentes a excreção após reinfeção ou reativação é menor do que após uma infecção primária (Malm and Engman, 2007).

A infecção congénita pode ocorrer como resultado de uma infecção primária ou recorrente (reativação ou reinfeção) na mulher grávida, a taxa de transmissão após uma infecção primária é aproximadamente 50%, enquanto numa infecção recorrente a transmissão para o feto é cerca de 0,5 a 2% (Adler and Marshall, 2007). A taxa de transmissão vertical na infecção primária também varia, consoante o período de gestação, as taxas do primeiro trimestre variam entre 31,9 e 41,6%, no segundo trimestre entre 35,5 a 45,1% e no terceiro trimestre a probabilidade de transmissão ao feto aumenta, variando de 58,2 a 74,1% (Revello and Gerna, 2004; Gindes et al., 2008; Chatzakis et al., 2020). Contrariamente, a transmissão para o feto no primeiro trimestre está associada a um risco mais elevado de infecção fetal severa e subsequentes sequelas no seu desenvolvimento, nomeadamente no sistema nervoso central. Cerca de 19,3% das crianças infetadas congenitamente por HCMV apresentam consequências fetais grandes no primeiro trimestre. Quando adquirida no final da gravidez a maioria das crianças não apresentam sintomas à nascença. Apenas 0,9 e 0,4% destas apresentam sintomatologia, respetivamente no segundo e terceiro trimestre. Ou seja, a taxa de infecção aumenta com a idade gestacional e a gravidade da infecção fetal diminui ao longo da mesma (Pass et al., 2006; Coonrod et al., 2008; Joseph et al., 2018; Chatzakis et al., 2020).

1.5.1 Prevalência Mundial

O HCMV é um vírus endémico e ubiquitário, cuja infecção ocorre durante todo o ano sem variações sazonais. As taxas de seropositividade na população variam de acordo com fatores geográficos, etnia, condições socioeconómicas e faixa etária. Estas taxas aumentam com a idade, em grupos socioeconómicos menos favoráveis em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Benoist et al., 2008a; Rowan et al., 2018). Estima-se que a prevalência mundial varie entre 60% a 90%, sendo que o primeiro pico de seropositividade ocorre na infância, resultado de transmissão vertical ou horizontal e o seguinte em jovens, devido maioritariamente à transmissão sexual (Rowshani et al., 2005). A seroprevalência mundial nas mulheres em idade reprodutiva, entre os 12 e os 49 anos, varia de 45 a 100% (Cannon et al., 2010). Mulheres seronegativas são mais

suscetíveis a uma infeção primária por este vírus durante a gravidez, afetando 1 a 7% de todas as gestações (Hyde et al., 2010).

O HCMV é o agente mais comum de infeção congénita, com uma prevalência de cerca de 0,2 a 2,2% de todos os nascimentos, sendo uma causa de morbilidade e mortalidade perinatal (Stagno et al., 1982; Allen et al., 2011). A prevalência de infeção congénita por HCMV em países industrializados (países dos EUA, Canadá, Japão, Austrália e Europa) varia entre 0,5 a 0,8%, enquanto a prevalência em países em desenvolvimento (países de África, América Central, Latina e do Sul, e Ásia) é mais elevada, podendo variar de 1% a 14% (Goderis et al., 2014; Lanzieri et al., 2014; Lunardi et al., 2019).

1.5.2 Prevalência em Portugal

Em Portugal, o Segundo Inquérito Serológico Nacional, que decorreu entre 2001 e 2002, estabeleceu pela primeira vez que a prevalência na população portuguesa é de 77% e que ocorre predominantemente nos primeiros anos de vida. Os distritos que apresentaram maior prevalência são Guarda, Braga e Vila Real, com 89,5%, 86,4% e 85,2%, respetivamente. Os que apresentaram menores percentagens foram Viana do Castelo com 65,7%, Leiria com 70,4% e Lisboa com 72,1%. Este estudo mostrou que 66,5% das crianças entre os dois e os quatro anos eram positivas para o HCMV. Esta elevada prevalência pode ser justificada pela transmissão oral, comum em crianças nesta faixa etária, sobretudo porque frequentam infantários. Entre os cinco e os 14 anos a prevalência mantém-se aproximadamente igual; dos 15 aos 19 anos houve um aumento de seropositivos, valores semelhantes observados na faixa etária do 20 aos 29 anos, resultado da exposição sexual, tendo sido observado valores mais elevados em indivíduos do sexo feminino; nos grupos etários seguintes houve um aumento gradual da proporção de indivíduos seropositivos para este vírus. É ainda de salientar, que a seroprevalência nas mulheres em idade reprodutiva é 75,5% para mulheres entre os 20 e os 29 anos e 81,5% para a faixa etária dos 30 aos 44 anos (Lopo et al., 2011).

A prevalência da infeção congénita pelo HCMV em Portugal foi estudada pela primeira vez em 2004, num Hospital de Lisboa, tendo-se obtido um valor de 0,7%. As amostras de urina foram analisadas pelo método de cultura por *shell-vials* (Lopo et al., 2004). Outro estudo, realizado a nível nacional, que decorreu entre agosto de 2003 e setembro de 2004, determinou que a prevalência era de 1,05%, este utilizou a técnica de *nested-PCR* em amostras de sangue seco (cartões do diagnóstico precoce) (Paixão et al., 2009). Por último, um estudo realizado em dois hospitais da Beira Interior, entre janeiro de 2007 e dezembro de 2008, mostrou que a prevalência foi de 0,4%, esta equipa testou as amostras por cultura celular através da técnica de *shell-vials* (Almeida et al., 2010).

1.6 Manifestações Clínicas

Após uma infecção por HCMV, o hospedeiro pode desenvolver diferentes manifestações clínicas, variando em função da idade e do sistema imunológico. A infecção primária é, na maioria dos casos, assintomática em indivíduos imunocompetentes, apenas 10% destes apresentam uma síndrome semelhante à da mononucleose, com febre persistente, fadiga, mialgia, dores de cabeça e garganta, adenopatia cervical, esplenomegalia, hepatomegalia e erupção cutânea. Estes sintomas podem persistir por semanas e não estão descritas sequelas a longo prazo (Landolfo et al., 2003; Ornoy and Diav-Citrin, 2006; Mocarski et al., 2013, pp. 1997-1999; Joseph et al., 2018).

Em grupos de alto risco, como por exemplo mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente transplantados e infetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma infecção por este vírus pode provocar diferentes manifestações clínicas, sendo uma causa de morbilidade e mortalidade significativa nestes indivíduos (Ornoy and Diav-Citrin, 2006; Boppana and Fowler, 2007, p. 795).

1.6.1 Manifestações Clínicas na mulher grávida

Menos de 5% das grávidas com infecção primária são sintomáticas, podendo em alguns casos, apresentar uma síndrome semelhante à da mononucleose. Os sintomas mais frequentemente encontrados são a febre, astenia, dores de cabeça, mialgias, rinites, faringites, tosse, aumento das enzimas hepáticas, linfocitose. Cerca de 42% destas gestantes, relataram ter três ou mais sintomas (Revello and Gerna, 2002; Nigro et al., 2003). A equipa de Nigro descreveu que a prevalência dos sintomas era superior em mulheres com infecção primária do que em mulheres com infecção secundária (Nigro et al., 2003).

1.6.2 Manifestações clínicas no Feto e Recém-Nascido

A infecção congénita pelo HCMV pode resultar, entre outros, na morte fetal, morte neonatal, atraso do crescimento intrauterino ou prematuridade (van Zuylen et al., 2014).

Dos recém-nascidos com infecção congénita, 10-15% serão sintomáticos à nascença. As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas são: baixo peso, petéquias ou púrpura, hepatoesplenomegalia, icterícia, anemia hemolítica, pneumonia, alterações neurológicas como calcificações intracerebrais, microcefalia, deficiência auditiva, coriorretinite, atrofia ótica, convulsões, e alterações em alguns resultados laboratoriais, como trombocitopenia, bilirrubinemia conjugada e o aumento da alanina aminotransferase (ALT) (Stagno and Whitley, 1985; Boppana et al., 1992; Ista et al., 1995). Podem ainda ser encontrados sinais e sintomas como hipotonia, letargia, falta de apetite, ventricomegalia, displasia cortical, ascite e enterocolite (Stehel and Sánchez, 2005). Ao contrário das manifestações com alterações neurológicas, a maioria destas manifestações tendem a ser autolimitadas e não requerem tratamento (Gandhi and Khanna, 2004). Dos recém-nascidos sintomáticos aproximadamente 10% morrem nas primeiras 6 semanas de vida (Boppana et al., 1992) e entre

estas crianças que sobrevivem, 40 a 58% desenvolvem sequelas permanentes a longo prazo, tais como atraso mental, paralisia cerebral, surdez neurosensorial e comprometimento na acuidade visual (Dollard, 2007; Mocarski et al., 2013, pp. 1997-1999). No entanto, 85-90% dos recém-nascidos com infecção congênita são assintomáticos aquando do nascimento, destes 5 a 15% vão desenvolver sequelas a longo prazo nos primeiros dois anos de vida, como as já referidas anteriormente, sendo a surdez neurosensorial a mais comum (Stagno and Whitley, 1985; Joseph et al., 2018).

O HCMV é um dos principais causadores de surdez infantil, sendo que mais de metade dos recém-nascidos com infecção congênita sintomática e cerca de 10% dos assintomáticos desenvolvem surdez neurosensorial. A perda de audição é geralmente progressiva em 50% dos casos, bilateral em 50% e tardia em 20%, esta sequela pode comprometer a linguagem e a aprendizagem da criança.

Em resumo, 30-40% dos recém-nascidos com infecção congênita por HCMV apresentam manifestações clínicas ao nascimento e/ou ao longo da vida (Lazzaroto, 2010; Britt, 2011, p. 733).

As crianças com infecção perinatal normalmente são assintomáticas, no entanto, 30% podem apresentar sintomas como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hepatite ou pneumonia. Sequelas neurológicas ou perda de audição não são características deste tipo de infecção (Gandhi and Khanna, 2004).

No que diz respeito a recém-nascidos prematuros, cerca de 15 a 25% desenvolvem pneumonias, hepatite ou sintomas semelhantes à sepsis, como por exemplo apneia, bradicardia, hepatoesplenomegalia, intestino distendido, anemia, trombocitopenia e alterações hepáticas (Kim, 2010).

1.7 Prevenção

A prevenção da infecção por HCMV na mulher grávida é de extrema importância, visto que, a infecção primária por HCMV durante a gestação está associada a maior risco de transmissão ao feto.

Grávidas oriundas de meios com escassez de recursos sanitários e/ou ambientes socioeconómicos mais restritos, são mais suscetíveis a este tipo de infeções. Neste tipo de infecção têm imensa relevância o estado do sistema imunitário da mulher grávida.

Ao longo dos anos têm vindo a ser estudadas várias estratégias para a prevenção da infecção por HCMV na mulher grávida.

1.7.1 Imunização Passiva

A imunização passiva com Imunoglobulina Humana específica para HCMV (HIG-HCMV) tem vindo a ser estudada, para prevenir a transmissão fetal do HCMV em mulheres grávidas com infecção primária e reduzir o risco de sequelas nas crianças (Rawlinson et al., 2016).

A HIG-HCMV é uma preparação combinada de imunoglobulina derivada de doadores com altos títulos de anticorpos contra o HCMV (Nyholm and Schleiss, 2010; Khalil et al., 2017). Vários estudos avaliaram a eficácia da administração com HIG-HCMV na prevenção de infecção por HCMV. A equipa de Nigro, em 2005, realizou um estudo, utilizando uma amostragem não aleatória, que incluiu 37 mulheres com infecção primária recente por HCMV, às quais foram administradas, por via intravenosa, 100 U/kg de HIG-HCMV mensalmente até ao parto. Foi observada uma diminuição significativa da taxa de transmissão da mãe para o feto entre o grupo placebo e o que recebeu HIG-HCMV, de 40% para 16%, respetivamente (Nigro et al., 2005). O estudo observacional realizado pela equipa de Buxmann permitiu concluir que, ao ser administrada HIG-HCMV em mulheres grávidas, a taxa de transmissão fetal diminuía (Buxmann et al., 2012). Outro estudo, com seleção aleatória da amostragem, participaram 124 mulheres com infecção primária por HCMV entre as cinco e 26 semanas de gestação, às quais foi administrada mensalmente HIG-HCMV até à 36ª semana de gestação. Os resultados mostraram uma diminuição na taxa de transmissão intrauterina de 44% no grupo placebo para 30% no grupo que recebeu HIG-HCMV, não sendo uma diferença tão significativa como a mostrada por Nigro e colaboradores. Os efeitos secundários observados foram parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino ou eclâmpsia pós-parto, sendo mais frequentes nas mulheres que receberam a HIG-HCMV, cerca de 13% em comparação com 2% nas que não receberam (Revello et al., 2014). Em 2014, 358 mulheres grávidas com infecção primária por HCMV foram selecionadas, de forma não aleatória, para participar num estudo, destas 164 receberam HIG-HCMV durante a gestação. No decurso do estudo não foram encontrados efeitos adversos graves ao ser administrada a imunoglobulina (Nigro et al., 2015). Atualmente encontra-se a decorrer um estudo com o objetivo de determinar se a administração de HIG-HCMV em mulheres grávidas com primoinfecção pelo vírus reduz o número de RN infetados, ou seja, avaliar o efeito profilático da HIG-HCMV durante a gravidez. Este inclui 800 mulheres grávidas com infecção primária por HCMV e os seus filhos serão avaliados no primeiro e segundo ano de vida, estando a conclusão do estudo prevista para agosto de 2021 (ClinicalTrials.gov NCT01376778). Por enquanto, não é recomendada rotineiramente a administração de HIG-HCMV em grávidas com infecção primária para prevenção de infecção congénita por HCMV (Rawlinson et al., 2017).

1.7.2 Imunização Ativa

A prevenção da infecção congénita por HCMV por imunização ativa, através da vacinação, seria o ideal para reduzir o impacto desta infecção nas crianças. Esta deve ter não só a capacidade de imunizar mulheres seronegativas contra o HCMV, mas também aumentar a resposta imune em mulheres seropositivas, de modo a evitar reinfeções (Marsico and Kimberlin, 2017). Existem duas abordagens para o desenvolvimento da vacina, uma viva baseada em vírus atenuados e uma sub-unitária composta pela glicoproteína B e o adjuvante MF59. Em 1994, foi desenvolvida a primeira vacina viva e atenuada contra o HCMV, a vacina *Towne* uma estirpe isolada a partir de uma criança com infecção congénita causada pelo vírus, que foi atenuada recorrendo a várias passagens em culturas de fibroblastos. Um estudo demonstrou que esta vacina não foi

eficaz no processo de imunização em mulheres seronegativas em idade fértil que tinham filhos em infantários (Adler et al., 1995). A falta de eficácia desta vacina pode estar associada a possíveis deleções genómicas devido à atenuação da estirpe o que pode afetar a imunogenicidade da vacina. A fim de ultrapassar a falta de eficácia desta vacina foram estudadas outras quatro vacinas quiméricas, em que foram utilizadas as estirpes *Towne* e *Toledo*. Estas foram administradas em indivíduos seropositivos para HCMV em dose única, e demonstraram ser bem toleradas e não causarem infeção sistémica (Heineman et al., 2006). Mais tarde, foi realizado um estudo onde foram testadas estas quatro vacinas. As vacinas foram administradas em dose única em indivíduos seronegativos para HCMV. Este estudo demonstrou que as vacinas foram bem toleradas pelos indivíduos, não existindo reações locais ou sistémicas graves, contudo mais estudos são necessários (Adler et al., 2016).

A glicoproteína B do envelope do HCMV (gB) está diretamente envolvida na ligação e entrada do vírus nos fibroblastos e é um dos principais alvos dos anticorpos neutralizantes (Bialas et al., 2015). Deste modo, começou a ser estudada uma vacina constituída pela gB juntamente com o adjuvante MF59 (gB/MF59). O primeiro ensaio clínico foi realizado em 1999, no qual a vacina foi administrada a indivíduos seronegativos em três doses (à nascença, um e 6 meses), tendo sido considerada uma vacina segura e imunogénica. No entanto, como se verificou que o título dos anticorpos diminuía rapidamente, cerca de duas semanas após a administração da terceira dose, efetuou-se um reforço com uma quarta dose, administrada aos 12 meses, tendo-se verificado um aumento imediato do nível de anticorpos. No estudo não se observaram efeitos adversos associados à vacina, apenas dor no local da injeção (Pass et al., 1999). Em 2009, foi realizado outro ensaio clínico em que foram vacinadas 234 mulheres seronegativas para HCMV, em idade fértil e mães há menos de um ano, ou seja, mulheres com elevado risco de adquirir uma infeção primária por HCMV. Foram administradas três doses, tal como no estudo anterior. A gB/MF59 mostrou uma eficácia aproximadamente de 50% contra infeção primária com base nas taxas de infeção por 100 pessoas/ano. Os autores do estudo concluíram que a vacina reduz a incidência da infeção materna e, consequentemente infeção congénita pelo HCMV. Foram relatadas reações locais como dor, eritema e reações sistémicas, como calafrios e mialgias (Pass et al., 2009). Dois anos mais tarde, foi efetuado outro estudo em que administraram a vacina gB/MF59 em três doses como descrito anteriormente em 120 mulheres na idade fértil (entre os 14 e os 40 anos) seropositivas para HCMV. Com este estudo, foi possível concluir que, os títulos de anticorpos nas mulheres vacinadas aumentaram e permaneceram elevados 6 meses após a administração da última dose da vacina, em comparação com o grupo placebo (Sabbaj, 2011). Por último, foi realizado um estudo em adolescentes do sexo feminino seronegativas para HCMV, os resultados da aplicação das três doses foram semelhantes ao estudo realizado pela equipa de Pass, tendo obtido uma eficácia de cerca de 45%. No geral a vacina foi bem tolerada (Bernstein et al., 2016).

Apesar dos vários estudos realizados até ao momento não existe uma vacina certificada, segura e eficaz para a prevenção de infeção por HCMV, são necessários mais ensaios clínicos para que uma vacina fique disponível.

1.7.3 Antivirais

Para prevenir a transmissão fetal, uma vez que a vacinação ainda não está disponível, após uma infeção primária por HCMV na mulher grávida, tem sido estudada a possibilidade de recorrer à terapia antiviral.

O antiviral Valaciclovir foi considerado seguro para ser administrado durante a gravidez (Leruez-Ville et al., 2016). Recentemente, foi realizado um ensaio clínico para avaliar a eficácia do fármaco na prevenção da transmissão vertical após infeção materna primária por HCMV, confirmada por serologia durante o primeiro trimestre. Neste estudo, 45 mulheres receberam 8 g/dia de Valaciclovir, até ser realizada a amniocentese (entre a 21ª e a 28ª semana de gestação). A infeção vertical foi verificada em 11,1% dos fetos em que as mães foram submetidas à terapêutica com Valaciclovir e 29,8% dos que pertenciam ao grupo placebo, ou seja, das mães que não foram submetidas ao fármaco. Neste ensaio conclui-se que a utilização do Valaciclovir reduziu a taxa de infeção fetal por HCMV em 71% após uma infeção primária durante a gravidez (Shahar-Nissan et al., 2020). Embora os dados sejam assertivos, o tamanho da amostragem é pequena e o desenho de estudo é limitado, deveriam ser realizados mais estudos para que possa ser recomendado o uso deste fármaco para a prevenção de transmissão vertical de HCMV.

1.7.4 Medidas de Higiene

Na ausência de uma vacina e de um tratamento seguros e eficazes disponíveis para a infeção congénita causada pelo HCMV, a melhor estratégia de prevenção é evitar a exposição das mulheres em idade fértil, especialmente as grávidas, ao vírus, para impedir a consequente transmissão ao feto. Este grupo de mulheres deve ser consciencializado sobre o vírus e as medidas de higiene a serem implementadas (Malm and Engman, 2007; Coll et al., 2009; Johnson and Anderson, 2014).

Uma fonte importante de exposição ao vírus Citomegálico para mulheres grávidas é o contacto com crianças até aos dois anos de idade, dado que estas podem eliminar o vírus na urina e na saliva, e por isso as grávidas devem evitar o contacto com estes fluidos das crianças. Neste sentido foram recomendadas pelo Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) algumas medidas para a prevenção de infeção pelo HCMV nestas mulheres, como lavar as mãos com sabão e água durante 15-20 segundos (especialmente depois de mudar a fralda, alimentar, limpar secreções respiratórias ou saliva, manusear brinquedos ou dar banho a uma criança), limpar brinquedos, bancadas e outras superfícies que possam ter contacto com a urina ou saliva da criança. Outras medidas importantes para a mulher grávida são: não partilhar alimentos, bebidas ou utensílios utilizados para tal, toalhas e escovas de

dentes; não colocar a chupeta da criança na boca; evitar beijar crianças na boca ou na face. (Cannon and Davis, 2005; Johnson et al., 2012; Johnson and Anderson, 2014; Ronchi et al., 2018).

O aconselhamento destas medidas, durante a gravidez, reduz significativamente a taxa de seroconversão para o HCMV e o risco de infeção congénita. Mulheres grávidas são mais recetivas e adotam mais facilmente estas medidas do que as restantes mulheres em idade fértil (Adler, 1991; Adler et al., 2004; Vauloup-Fellous et al., 2009). Revello e colaboradores demonstraram que dar a conhecer informações sobre estratégias de prevenção a mulheres grávidas com risco de adquirir infeção por HCMV é eficaz, pois 93% das mulheres inseridas no estudo acharam que o conhecimento e as recomendações dadas poderiam ser uma mais-valia (Revello et al., 2015). A prevenção através da educação de mulheres em risco sobre a transmissão do vírus e de medidas preventivas de higiene pode ter um impacto significativo na saúde pública (Wizman et al., 2016). Assim sendo, existem vários estudos desenvolvidos, em diferentes países, sobre a consciencialização da população sobre HCMV e a infeção congénita demonstraram que, a percentagem de mulheres com conhecimento sobre o vírus é muito baixa. Em 2006, Jeon e colaboradores realizaram um estudo nos EUA que concluiu que apenas 22% das mulheres tinham conhecimento sobre o HCMV (Jeon et al., 2006). Dois grupos de investigadores avaliaram o nível de conhecimento sobre a infeção congénita pelo HCMV, nos EUA, num intervalo de quatro anos, através de um inquérito realizado pela *HealthStyles™*. Ross e colaboradores concluíram que somente 14% das mulheres não apresentava qualquer conhecimento sobre o vírus (Ross, 2008). Entretanto Cannon e a sua equipa, em 2010, verificaram que a percentagem de mulheres que tinha ouvido falar sobre infeção congénita causada por este vírus era de 13% e de homens era 7% (Cannon et al., 2012). Outro estudo, realizado na Suíça em 2015, mostrou que 39% das mulheres que já tinham sido mães conheciam o HCMV e cerca de 20% tinham recebido informação sobre as medidas preventivas durante a gravidez. Curiosamente estas mulheres apresentavam maior conhecimento sobre outras infeções, como o HIV, rubéola, sífilis e toxoplasmose, embora a sua incidência seja menor durante a gestação (Willame et al., 2015). Em 2016, no Canadá, Wizman e os seus colaboradores avaliaram a consciencialização sobre o HCMV em 491 mulheres grávidas, concluindo que 85% não tinham conhecimento sobre o vírus nem sobre os riscos associados ao HCMV na gravidez (Wizman et al., 2016). Em 2017, nos EUA um estudo questionou 726 mulheres sobre HCMV, os resultados mostraram que apenas 20% tinha ouvido falar do vírus. Após receberem informação sobre o HCMV, a maioria das participantes concordaram que o rastreio pré-natal ou neonatal deveria ser realizado (Tastad et al., 2019).

É possível concluir, com os dados apresentados, que mesmo com o evoluir dos anos, a consciencialização das mulheres sobre o HCMV permanece baixa. Os estudos apontam para a necessidade de consciencialização sobre o HCMV em mulheres grávidas ou que pensem em engravidar e de educação quanto a medidas que podem ser eficazes na prevenção de infeção primária.

A informação sobre o HCMV, o aconselhamento sobre o risco de infecção congénita e quais as medidas preventivas que evitam a infecção devem ser fornecidas principalmente pelos obstetras e ginecologistas, dado serem os profissionais de saúde que têm maior contacto com as mulheres grávidas ou que pensam em engravidar (Korver et al., 2009). Vários autores apontam que os profissionais de saúde, como médicos de clínica geral, ginecologistas, obstetras, parteiras e pediatras, não têm conhecimento suficiente sobre a infecção por HCMV, como por exemplo, as vias de transmissão do HCMV, sintomatologia ou medidas de prevenção a adotar (Korver et al., 2009; Cordier et al., 2012; Pereboom et al., 2014; Adli et al., 2018).

Parece consensual que investir em ações de formação dos profissionais de saúde sobre o HCMV, poderia ajudar a reforçar as medidas preventivas e consciencializar as mulheres em risco de infecção primária por HCMV e desta forma diminuir a taxa de infecção congénita e as posteriormente sequelas no feto e no RN (Wizman et al., 2016; Rawlinson et al., 2017).

1.8 Métodos de diagnóstico

Atualmente existem diversos métodos disponíveis para a deteção do HCMV nos diferentes tipos de amostras. Os métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, tem-se tornado o método de referência para o diagnóstico de infeções por HCMV.

1.8.1 Citologia e Histologia

As técnicas citológicas e histológicas permitem o diagnóstico de uma infecção por HCMV, através da observação de células citomegálicas, em biópsias, citologias ou autópsias. São visualizadas inclusões intranucleares basófilas, isto é, com coloração azulada, normalmente denominadas por “olho de coruja”, que podem apresentar cromatina marginalizada, normalmente rodeada por um halo claro, o designado efeito citopático característico (CPE). Estes testes têm especificidade para o diagnóstico do HCMV mas apresentam várias desvantagens, tais como: a morosidade, a necessidade de grande experiência por parte de quem executa e visualiza as preparações e a baixa sensibilidade, existir a possibilidade do HCMV poder infetar tecidos sem produzir alterações morfológicas e por isso as células citomegálicas podem não ser visualizadas. A sensibilidade dos testes histológicos pode ser aumentada recorrendo à imuno-histoquímica. Para a colheita das amostras, são necessários procedimentos invasivos como as biópsias. Estes procedimentos são utilizados quase exclusivamente em laboratórios de anatomia patológica (Drew, 1988; Hodinka, 2015, p. 1722; Caruso et al., 2016, p. 157).

Estas técnicas têm caído em desuso devido às desvantagens acima referidas, pelo que atualmente é sugerida a confirmação do diagnóstico de infecção pelo HCMV por técnicas de biologia molecular ou serológicas.

1.8.2 Serologia

A serologia tem como base a detecção de anticorpos no soro humano, permitindo ter a noção do estado imunitário do indivíduo, em relação ao HCMV. É possível diagnosticar uma infecção aguda ou primária, através da pesquisa da Imunoglobulina M (IgM) ou uma infecção antiga pela presença da Imunoglobulina G (IgG). É importante realizar estes testes em pacientes imunocomprometidos, em particular no contexto pré-transplantação, e em mulheres grávidas, pelo simples fato de que este vírus poder originar nos primeiros infecções graves, e nas mulheres grávidas, infecção vertical com importantes sequelas no feto (Grangeot-Keros and Cointe, 2001; Ross et al., 2011).

Atualmente estão disponíveis diversos testes serológicos para diagnóstico das infecções virais, como a fixação do complemento (CF), inibição de hemaglutinação (HI), neutralização (NT), imunofluorescência indireta (IF), imunofluorescência anticomplemento (ACIF), radioimunoensaio, quimioluminescência e *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA), sendo os dois últimos os mais amplamente utilizados (Revello et al., 2004; Hodinka, 2010, pp. 133-150; Ross et al., 2011).

Uma infecção primária pode ser diagnosticada através da presença da IgM e da seroconversão da IgG. A presença de IgM é geralmente indicativa de infecção recente mas a sua presença não é suficiente para que seja diagnosticada uma infecção primária por HCMV. Durante uma infecção primária a IgM atinge o pico 7 a 10 dias após o início da infecção e normalmente diminui para níveis indetectáveis dentro de um a dois meses (Figura 1.4). É frequente o aparecimento de resultados falsos-positivos, porque esta imunoglobulina pode persistir por vários meses após uma infecção primária e pode ser detetada durante a reativação do vírus.

Um teste positivo para IgG indica que um indivíduo foi infectado pelo HCMV, sem precisar o momento do contágio. Portanto, é necessário que exista seroconversão do anticorpo IgG, ou seja, uma primeira amostra com resultado negativo para IgG e uma segunda amostra com IgG positiva, estas com um intervalo de um a três semanas, para que seja uma clara evidência de uma infecção primária recente. A IgG aparece vários dias após a detecção de IgM, atingindo valores mais elevados que IgM e persiste ao longo da vida. Quando surge uma reativação ou reinfeção, há um aumento significativo de anticorpos IgG, como apresentado na Figura 1.4 (CDC, 2020; Hodinka, 2010, pp. 133-150; Ross et al., 2011).

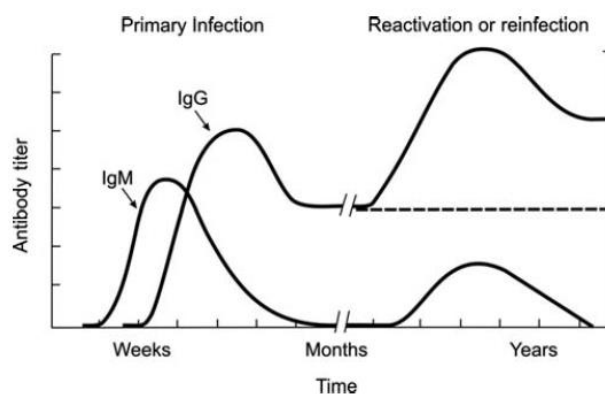


Figura 1.4 - Diagrama da resposta de anticorpos IgM e IgG após infecção primária ou recorrente por HCMV. A linha a tracejado representa os anticorpos IgG específicos para HCMV (Hodinka, 2010, pp. 133-150).

O teste de avidéz das IgG permite distinguir uma infecção primária de uma infecção antiga e por isso é um dos testes mais utilizados para confirmar o diagnóstico de uma infecção primária quando estamos perante um resultado positivo de IgM. Esta técnica tem como princípio, medir a força de ligação entre os anticorpos IgG e os antígenos do vírus, após tratamento com agentes desnaturantes, como por exemplo a ureia, durante a execução do ensaio imunoenzimático. Os níveis de avidéz são expressos através do índice de avidéz (IA), calculado da seguinte forma:

$$IA = \frac{\text{Absorvância do CMV do poço lavado com ureia}}{\text{Absorvância do CMV do poço lavado sem ureia}} \times 100$$

Quando um IA é inferior a 30%, é indicativo de uma infecção primária recente, adquirida há menos de três meses, pois os anticorpos IgG apresentam baixa força de ligação, isto é, baixa avidéz. Avidéz alta, ou seja, IA superior 65%, é sugestivo de uma infecção antiga, dado a força de ligação já ser forte (Grangeot-Keros et al., 1997; CDC, 2020).

1.8.3 Cultura Celular

O isolamento do HCMV em culturas celulares é considerado o método de referência para o diagnóstico da infecção causada pelo vírus Citomegálico (Razonable et al., 2002; Ross et al., 2011). O HCMV pode ser isolado a partir de amostras de urina, sangue, saliva, lágrimas, leite, esperma, fezes, secreções vaginais ou cervicais (Ho, 1991, pp. 75-77).

Esta técnica consiste no isolamento do vírus em culturas de fibroblastos de tecidos embrionários ou linhas celulares de pulmão fetal humano, como WI-38, MRC-5 ou IMR-90, seguida da observação ao microscópio dos CPEs provocados pelo vírus (Paya et al., 1987; Hodinka, 2015, p. 1725). Os CPEs estão diretamente relacionados com a quantidade de vírus presente na amostra. É considerado um método lento, pois o aparecimento dos CPEs pode demorar entre 7 a 21 dias a surgir, dependendo da concentração inicial do vírus (Poncet et al., 2006; Ross et al., 2011; Hodinka, 2015, pp. 1725-128). Foi descrito que as linhas celulares MRC-

5 eram preferenciais a outras linhas celulares, como as WI-80, visto que nas primeiras o CPE foi observado mais cedo. As linhas celulares com baixas passagens (10 a 24) são mais suscetíveis (Ho, 1991, pp. 75-77).

Resumindo, apesar da boa sensibilidade e especificidade (100%), a técnica requer a manutenção de culturas celulares, é muito dispendiosa, trabalhosa, morosa e requer recursos humanos experientes. O transporte das amostras ao laboratório é sensível, pois é muito importante evitar a perda de viabilidade do vírus e qualquer tipo de contaminação (Barbi et al., 2006). É um método que não está acessível à automatização e, portanto não é adequado para a realização do rastreio ou numa situação de urgência (Benoist et al., 2008b; Boppana et al., 2011; Marsico and Kimberlin, 2017).

De forma a ultrapassar as desvantagens acima referidas, surgiu o método *Shell Vial*, descrito por Gleaves e colaboradores. Para executar esta técnica, são utilizados tubos que têm uma lamela no fundo sobre a qual cresce a monocamada de células. A amostra em estudo é adicionada à cultura e de seguida realiza-se uma lenta (para não lisar as células) e longa centrifugação (para auxiliar a adsorção dos vírus às células e evitar que os vírus percam viabilidade). Após incubação, é efetuada uma marcação com anticorpo monoclonal, específico para o HCMV. A reação anticorpo-antigénio é visualizada após adição de um conjugado marcado com um fluorocromo. A emissão de fluorescência indica um resultado positivo, permitindo observar as inclusões virais nos núcleos, indicativas do início do ciclo de replicação do vírus, ainda antes do aparecimento dos CPEs. Esta técnica permite dar resultados em 24 ou 48 horas (Gleaves et al., 1984; Gleaves et al., 1985; Chou and Scott, 1988; Hodinka, 2015, pp. 1725-1728).

Foi demonstrado que, a realização da técnica em placas de microtitulação de 96 poços é rápida, simples de executar e mais barata, porque é possível testar, em simultâneo, um maior número de amostras. Esta técnica apresenta uma sensibilidade de 94,5% e especificidade de 100% (Boppana et al., 1992).

1.8.4 Antigenémia

A antigenémia é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico da infeção ativa por HCMV em indivíduos imunodeprimidos (The et al., 1990). A técnica consiste no uso de anticorpos monoclonais que detetam o antigénio viral, em leucócitos do sangue periférico, a pp65, proteína estrutural expressa no interior dos leucócitos durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV. Pode ser realizada por técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência indireta (Hodinka, 2015, pp. 1722-1723; Gerna et al., 1992).

O processamento laboratorial deste método envolve várias etapas: lise dos eritrócitos e isolamento dos leucócitos do sangue; preparação das lâminas (fixação com formaldeído ou paraformaldeído, permeabilização com detergente não iónico); coloração por imunoperoxidase ou imunofluorescência com recurso aos anticorpos monoclonais contra o HCMV e por fim avaliação em microscópio ótico ou

fluorescente, respetivamente, e contagem das células positivas (The et al., 1990; Erice et al., 1992; van der Ploeg et al., 1992; Hodinka, 2015, pp. 1722-1723).

Os resultados visualizados ao microscópio fluorescente (caso da técnica de imunofluorescência indireta), em que é considerado um resultado positivo quando são observados núcleos das células infetadas com aspeto homogéneo coradas de amarelo a um tom esverdeado, como representado na Figura 1.5 (Hodinka, 2015, pp. 1722-1723).

A técnica de antigenémia é um método simples, rápido (resultado em quatro a cinco horas), possui boa sensibilidade e especificidade e, para além de um microscópio de fluorescência e de uma citocentrífuga não requer equipamentos mais específicos o que o torna num teste económico. Permite um diagnóstico precoce, visto que a infeção pelo vírus Citomegálico pode ser detetada antes do início dos sintomas. O resultado para além de qualitativo pode ser quantitativo, o que possibilita a correlação da virémia com a gravidade da doença provocada pelo HCMV, a monitorização da infeção, a eficácia da terapêutica e a orientação da terapêutica empírica (The et al., 1990; van der Ploeg et al., 1992; Gerna et al., 1992; Niubò et al., 1996; Hodinka, 2015, pp. 1722-1723). O resultado quantitativo geralmente é expresso como a razão entre o número de células positivas para o antigénio, pelo número total de leucócitos analisados (Van der Bij et al., 1988; Hodinka, 2015, pp. 1722-1723). A presença de um baixo número de células positivas indica geralmente uma infeção assintomática, enquanto se o número de células for elevado está associado a doença clinicamente significativa (Hodinka, 2015, pp. 1722-1723).

A técnica apresenta algumas limitações, só permite a utilização de amostras de sangue total, é necessário o processamento da amostra num prazo máximo de 6 horas, para que não haja diminuição da sensibilidade, e de pessoal qualificado, dado que o resultado depende da observação cuidadosa e interpretação por parte do operador. A falta de padronização entre laboratórios limita a aplicabilidade e reprodutibilidade dos resultados, (Gerna et al., 1992; van der Ploeg et al., 1992; Boeckh et al., 1994; Razonable et al., 2002).

Atualmente, a antigenémia tem vindo a ser substituída por técnicas de biologia molecular quantitativas, como por exemplo a PCR em tempo real, que tem a vantagem de permitir o armazenamento das amostras e apresenta maior sensibilidade (Hernando et al., 2005).

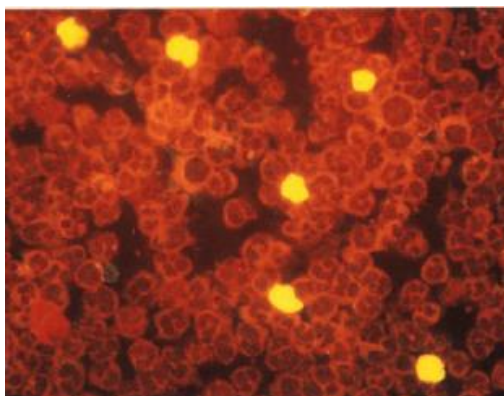


Figura 1.5 - Método de Antigenémia, observação da coloração dos núcleos de leucócitos infectados por HCMV (técnica de imunofluorescência indireta) (Hodinka, 2015, pp. 1722-1723).

1.8.5 Técnicas de PCR

A PCR foi desenvolvida pelo americano Kary Mullis, em 1983 e baseia-se na amplificação *in vitro* de uma sequência alvo específica de DNA, assim, uma molécula de DNA molde pode originar milhões de cópias idênticas (Mullis et al., 1986; Mullis, 1990). Mullis viu o seu trabalho a ser reconhecido dez anos mais tarde ao ser premiado com o prémio Nobel da Química (Kubista et al., 2006).

Para a deteção de DNA do HCMV é necessário efetuar a sua extração dos produtos biológicos tais como sangue total, leucócitos, plasma ou de tecidos, provenientes de biópsias ou ainda de outros fluidos biológicos como a urina, saliva, LCR e LBA (Carraro and Granato, 2003; Ross et al., 2011). De acordo com o produto a estudar podem ser utilizados vários protocolos manuais ou automáticos.

Para a realização da técnica de PCR é necessário selecionar a sequência de DNA que se pretende amplificar e ter a mistura de reagentes, que contém, *primers*, a enzima DNA polimerase, desoribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), tampão Tris-HCl e $MgCl_2$. Os *primers* são oligonucleótidos responsáveis pelo início da reação, estes hibridam com a sequência alvo e flanqueiam a região a ser amplificada (Erlich, 1989). A DNA polimerase é a enzima que sintetiza a nova cadeia de DNA, complementar à cadeia molde. A enzima mais comumente utilizada é a Taq polimerase, isolada a partir da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. Esta enzima tem como principal característica, o facto de ser termo-estável, isto é, resistente a elevadas temperaturas, o que permite que permaneça ativa na fase de desnaturação do DNA (Saiki et al., 1988; Holland et al., 1991). A Taq polimerase tem atividade exonucleotídica, construindo o DNA de 5' para 3'. Os dNTP's são componentes essenciais nesta mistura, visto que sem eles não é possível gerar a nova cadeia de DNA. O tampão tem como função manter o pH da reação estável e otimizar a atividade da Taq polimerase, sendo o Tris-HCl o mais utilizado. Os iões de magnésio (Mg^{2+}) atuam como um cofator para a atividade da DNA polimerase, permitindo o emparelhamento dos dNTPs. Estes estimulam a formação de ligações fosfodiéster entre o grupo 3'OH do *primer* e o grupo fosfato de um dNTP e facilitam a formação do complexo entre os *primers* e o DNA molde (van Pelt-Verkuil et al., 2008, pp.161-197).

Numa reação de PCR, o número de ciclos pode ser variável consoante o objetivo em estudo. Cada ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação, hibridação e extensão. Na primeira fase, ocorre a desnaturação da dupla cadeia de DNA, através do aquecimento da solução, normalmente, a 95 °C durante 15 segundos. A segunda fase consiste na hibridação dos *primers*, um *primer* vai hibridar com a extremidade 3' da cadeia de DNA molde e o outro hibrida com a extremidade 3' da cadeia de DNA molde complementar. Nesta fase a temperatura baixa abruptamente, para o valor que permite a ligação do *primer*, podendo variar entre 50 e 60 °C, dependendo da composição dos *primers*. Por fim, acontece a extensão do DNA, nesta fase a temperatura é aumentada para os 72 °C, esta temperatura é a ideal para a atividade da DNA polimerase (Berg et al., 2015, pp. 141-142). No final do primeiro ciclo obtém-se duas novas cadeias de DNA idênticas à sequência alvo, no segundo são obtidas quatro cadeias de DNA e assim sucessivamente, ou seja, o número de sequências duplica a cada ciclo. Desta forma há uma acumulação exponencial do DNA alvo, ao fim de n ciclos há a produção 2^n sequências de DNA, onde n é o número de ciclos (Saiki et al., 1988; Willey et al., 2008, pp. 361-366). Todo o procedimento é realizado num termociclador programável, que controla a temperatura, os intervalos de tempo de cada ciclo e o número de ciclos da reação (Hodinka, 2015, pp. 1723-1725). O tempo dos ciclos da PCR dependem do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende amplificar.

Para a deteção do produto de amplificação, na PCR convencional, é realizada uma eletroforese em gel. Esta consiste na migração dos fragmentos de DNA gerados no gel em função do seu peso molecular quando submetidas a um campo elétrico (Baumforth et al., 1999; Yilmaz et al., 2012, pp. 33-40). Podem ser usados diferentes géis dependendo do tamanho dos fragmentos que se pretende separar, sendo o gel de agarose o mais fácil de preparar e o mais eficaz na separação dos fragmentos de DNA maiores, variando entre 100 pares de bases (pb) e 10 quilo-pares de bases (kb) (van Pelt-Verkuil et al., 2008, pp. 147-150; Lee et al., 2012). A agarose é um polissacarídeo isolado de algas marinhas que forma uma malha porosa, cujo tamanho dos poros pode ser controlado através da concentração utilizada. As concentrações de 1 a 2% são as mais utilizadas. Quanto maior a concentração de agarose no gel mais densa vai ser a malha, a velocidade de migração diminui e o tamanho do poro é menor. O DNA é pipetado no respetivo poço do gel, de seguida é aplicada uma corrente elétrica, como as moléculas de DNA são carregadas negativamente quando sujeitas à corrente elétrica vão migrar do polo negativo para o positivo (van Pelt-Verkuil et al., 2008, pp. 147-150; Lee et al., 2012; Yilmaz et al., 2012, pp. 33-40). Para a visualização dos fragmentos de DNA no gel é adicionado um composto fluorescente, como o brometo de etídio ou *SYBR Green*, que se intercala entre as bases do DNA, permitindo a visualização de bandas, isto é, dos fragmentos de DNA, quando sujeitos a radiação ultravioleta (Roche, 2006). O brometo de etídio é considerado um resíduo perigoso, por ser mutagénico e cancerígeno, sendo necessário cuidado no seu manuseamento, enquanto o *SYBR Green* tem baixos níveis de toxicidade (van Pelt-Verkuil et al., 2008, pp. 147-150). O tamanho do fragmento é estimando quando se compara as bandas obtidas na PCR da amostra com as bandas de um marcador de peso molecular conhecido (Baumforth et al., 1999; van Pelt-Verkuil et al., 2008, pp. 147-150).

A técnica de PCR tornou-se um método importante para o diagnóstico de infecções virais, como a infecção causada pelo HCMV, e tem vindo a substituir as técnicas convencionais, como a antigenémia ou cultura celular. Para além das técnicas comerciais, existem técnicas desenvolvidas nos próprios laboratórios, são as chamadas técnicas *in house* (Sia and Patel, 2000; Razonable et al., 2002; Yan et al., 2002). A diversidade de protocolos utilizados gera dificuldades na padronização e dificulta a identificação do melhor método, com sensibilidade e especificidade mais altas na deteção de infecções por HCMV (Sia and Patel, 2000).

A PCR tem sido considerada a técnica *gold standard* em várias áreas científicas, como a da virologia. Esta, para além de permitir a amplificação de pequenas quantidades de DNA, tem como principais vantagens a elevada especificidade e sensibilidade. É uma técnica rápida e segura, mas no caso da PCR convencional tem a desvantagem dos resultados serem apenas qualitativos, a quantidade de DNA presente na amostra é estimada através da observação das bandas na eletroforese, como referido anteriormente (Mackay et al., 2002; Mackay, 2004).

1.8.5.1 *Nested-PCR*

A técnica *nested-PCR* tem o mesmo princípio que a PCR convencional, a diferença é que esta consiste em duas amplificações de DNA consecutivas, isto é, há uma re-amplificação do produto da primeira reação de PCR. Na primeira amplificação é utilizado um par de *primers* externos, que dá origem a um fragmento maior que contém a sequência de DNA alvo e vai ser utilizado como molde para a segunda amplificação, com recurso a um novo par de *primers* internos, que origina um fragmento mais pequeno, o produto final (Porter-Jordan et al., 1990; Bermingham and Luettich, 2003). A visualização dos resultados é igual à PCR convencional (Figura 1.6).

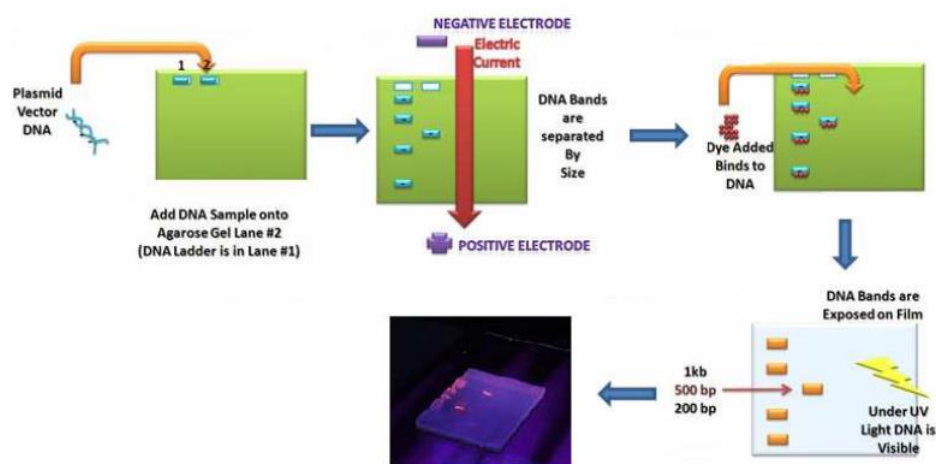


Figura 1.6 - Visualização dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose (Yilmaz et al., 2012, pp. 33).

Esta técnica foi desenvolvida de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR convencional. O aumento da sensibilidade ocorre devido ao número total de ciclos ser maior e o aumento da especificidade

deve-se ao fato do produto final depender da ligação a dois pares de *primers*. Uma das principais desvantagens é a elevada taxa de contaminação que pode ocorrer aquando a transferência do produto da primeira amplificação para a segunda (Sheehan and Tyther, 2009, p. 58).

1.8.5.2 PCR em Tempo Real

A técnica PCR em tempo real (PCR-RT) foi descrita em 1993, por Higuchi e colaboradores, e é uma variação da PCR convencional, com a particularidade de permitir a amplificação, deteção e quantificação em simultâneo e em tempo real, com base na deteção de fluorescência (Higuchi et al., 1993).

Para gerar fluorescência é necessária a adição de um corante fluorescente que se ligue ao produto formado. Estes podem dividir-se em dois grupos: agentes intercalantes na molécula de DNA de cadeia dupla como o *SYBR Green*, ou sondas fluorescentes, como por exemplo as sondas de hidrólise (*TaqMan*), as sondas de hibridização e as *molecular beacons* (Walker, 2001; Arya et al., 2005; Shipley, 2006, pp. 1-30).

O *SYBR Green*, como já referido anteriormente, é um corante fluorescente que se intercala nas moléculas de DNA de cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente (Figura 1.7(A)). A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de DNA presente na reação em cada ciclo. Tem a vantagem de ser sensível e aplicável a qualquer produto de PCR, permite a utilização de *primers* já existentes. No entanto, a especificidade é baixa, pois existe a probabilidade de haver fluorescência de um produto não pretendido, como devido à formação de dímeros de *primers* e outros produtos não específicos, este acontecimento vai originar a que haja erros na quantificação (Walker, 2001). De forma a validar a especificidade, é necessário analisar as curvas de dissociação para determinar a temperatura de dissociação da cadeia dupla pela ação do aumento de temperatura. Estas permitem a deteção de produtos de amplificação diferentes do pretendido. Devido à falta de especificidade este composto não deve ser utilizado em testes de diagnóstico, mas devido ao baixo custo por vezes é usado em rastreios (Espy et al., 2006; Smith and Osborn, 2009).

As sondas de hidrólise como as *TaqMan* são as mais amplamente utilizadas. São oligonucleotídeos fluorescentes desenhadas para a sequência alvo, foram descritas por Holland e a sua equipa em 1991 (Holland et al., 1991). A sonda encontra-se marcada com um fluoróforo na extremidade 5', emissor (*reporter*) e um recetor de fluorescência na extremidade 3' (*quencher*). Após o processo de desnaturação, ocorre a fase de hibridação dos *primers* e da sonda com a cadeia de DNA molde. Quando a sonda está intacta dá-se o fenómeno designado de FRET (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), isto é, há emissão de fluorescência por parte do *reporter* na forma de luz ou calor e a absorção pelo *quencher*, dada a proximidade entre estes. Este fenómeno não ocorre se estes não estiverem próximos, pelo que, durante a fase de extensão, quando a enzima Taq polimerase cliva a sonda, ocorre a separação do *reporter* do *quencher*, e como deixa de haver proximidade, há emissão de fluorescência por parte do *reporter*, como representado na Figura 1.7(B). Assim, a fluorescência emitida de forma exponencial, ciclo após ciclo, é detetada, sendo

diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado (Livak et al., 1995; Arya et al., 2005; Real-time PCR handbook, 2016, pp.10-13).

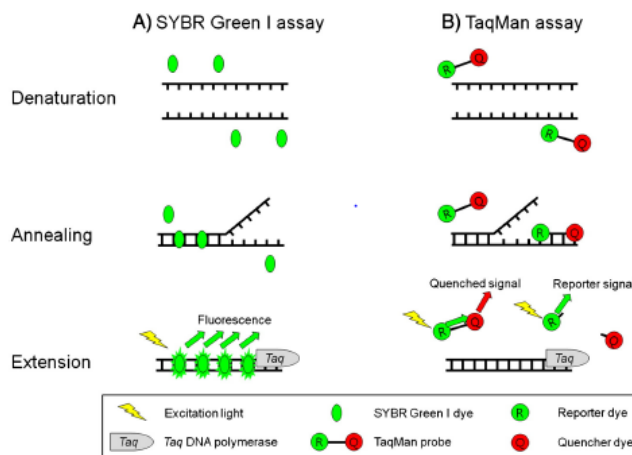


Figura 1.7 - Princípio de funcionamento do SYBR Green (A) e das sondas TaqMan® (B) (Kim et al., 2013).

Para realizar a PCR-RT é necessário uma fonte de energia que promova a excitação do composto fluorescente e outra que efetue a detecção da fluorescência emitida, tudo isto a ser visualizado em tempo real. Este tipo de termocicladores estão associados a *softwares* que permitem a quantificação e análise dos resultados através da construção de gráficos de amplificação (Gibson et al., 1996; Holland et al., 1991). A curva de amplificação gerada mostra três fases distintas: exponencial, linear e estacionária ou *plateau*. A fase exponencial é a fase onde todos os reagentes estão em excesso, a amplificação ocorre a uma taxa exponencial máxima, ou seja, os produtos de reação são duplicados a cada ciclo, se a eficiência for de 100%. É considerada uma reação específica e precisa. Na fase linear a eficiência de amplificação diminui, como é possível observar no declive da reta, nesta os componentes de reação estão a ser consumidos. Por fim, na fase estacionária há a escassez dos reagentes na reação, deixa de existir a formação de novos produtos, a fluorescência emitida passa a ser constante (Shiple, 2006, pp. 1-30; Yuan et al., 2006).

Na figura 1.8 está demonstrado o modelo de um gráfico de amplificação obtido no final de uma reação de PCR-RT, é de notar alguns conceitos:

- ✓ A linha de base ou *baseline* é determinada pelo *software* nos primeiros ciclos da reação, geralmente entre o terceiro e o 15º, é traçada onde há uma ligeira alteração no sinal de fluorescência, contudo o sinal ainda se encontra abaixo do limite de detecção do equipamento. O sinal abaixo da linha de base pode ser equiparado ao “ruído de fundo”, ou *background*. Esta pode ser alterada manualmente pelo utilizador (Arya et al., 2005; Real-time PCR handbook, 2016, p.6).
- ✓ O *Threshold* é uma linha determinada arbitrariamente pelo *software* em função da variabilidade da *baseline*. É definida a partir do qual o sinal de fluorescência é detetado a

níveis significativos, esta encontra-se acima da *baseline* e é traçada durante a fase exponencial da reação, permitindo a distinção do sinal de fluorescência da *baseline* do sinal de amplificação relevante. O *software* normalmente traça esta linha quando a fluorescência detetada excede 10 desvios padrão da fluorescência média de base durante os ciclos três e 15 (Walker, 2001; Arya et al., 2005; Real-time PCR handbook, 2016; TaqMan Guide, 2014, pp.17-20).

- ✓ O *Cycle threshold* (CT) é o número do ciclo no qual o sinal de fluorescência da reação se cruza com o *threshold*. O valor do CT é inversamente proporcional ao número de cópias inicial da sequência alvo. Uma maior concentração de DNA alvo no início da reação leva a que seja necessário um menor número de ciclos para que o sinal de fluorescência detetado se cruze com a linha do *threshold* (Gibson et al., 1996; Arya et al., 2005; Real-time PCR handbook, 2016, p.6).

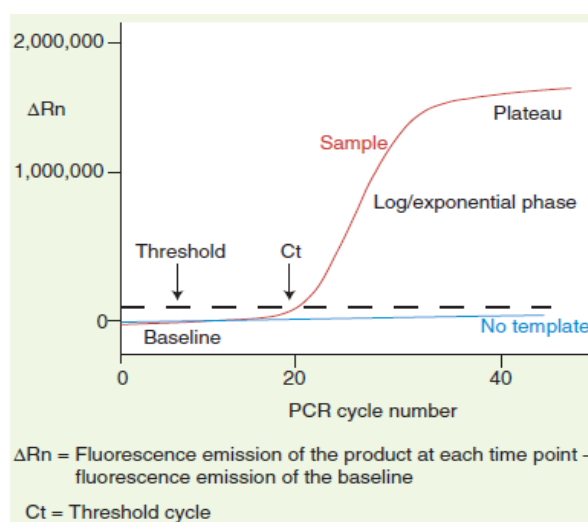


Figura 1.8 - Modelo apresentando as diferentes fases da curva de amplificação da PCR-RT (Arya et al., 2005).

A quantificação do DNA através da PCR-RT pode ser realizada de duas formas distintas: a relativa e a absoluta. A quantificação relativa é indicada para determinar alterações da expressão génica e consiste na comparação dos valores do CT da amostra alvo com uma amostra calibradora. Os valores obtidos são normalizados utilizando um gene endógeno ou de referência (Arya et al., 2005; van Pelt-Verkuil et al., 2008, 161-197). A quantificação absoluta baseia-se na determinação da concentração inicial de uma amostra, a partir de uma curva padrão. Esta curva é obtida através de uma amostra padrão de concentração conhecida que é diluída diversas vezes. Na Figura 1.9 está representada um exemplo de uma curva padrão, a partir da qual é extrapolada a concentração da amostra de forma a obter a sua quantificação. Este tipo de quantificação é mais precisa que a realizada por eletroforese, a concentração é expressa em valor absoluto (Arya et al., 2005; Real-time PCR handbook, 2016, pp.40-41; Roche, 2006, pp. 204-205).

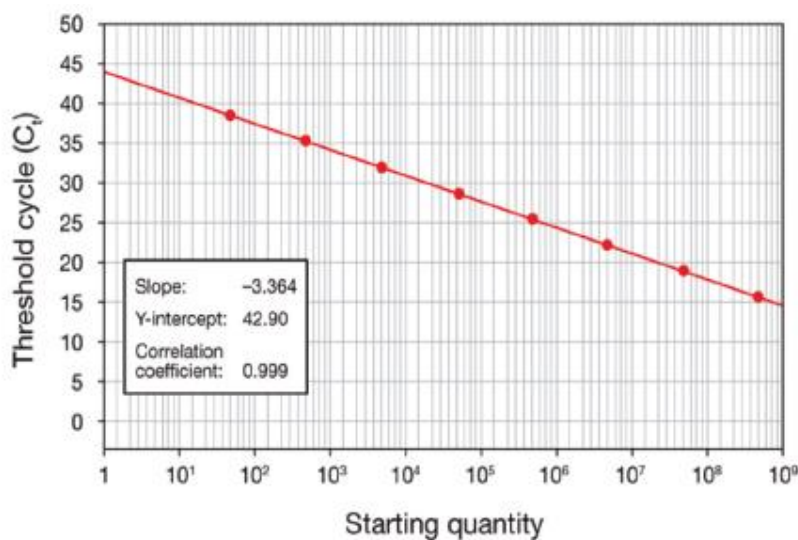


Figura 1.9 - Exemplo de uma curva padrão (PCR-RT). No eixo dos X estão representadas as concentrações em escala logarítmica do padrão e no eixo dos Y os valores de CT (Applied Biosystems, 2016, p.7).

A PCR-RT trouxe inúmeras vantagens relativamente à PCR convencional. A PCR-RT apresenta elevada sensibilidade e uma maior especificidade em comparação com a PCR convencional. Quando utilizadas sondas fluorescentes, para além de ter que ocorrer hibridação dos *primers* com a sequência alvo a amplificar, também tem que haver hibridação da sonda, fazendo com que haja um aumento da especificidade. Outras vantagens: permitir a monitorização e quantificação do DNA em tempo real; menor risco de contaminação, visto que não existe a necessidade de manipulação pós-amplificação, e a reação ocorre num único tubo ou poço de placa; é segura, pois não impõe a necessidade de manipular substâncias tóxicas e mutagénicas, como o brometo de etídio; o tempo de análise torna-se mais curto porque não é necessário realizar a eletroforese para a visualização dos resultados; permite um aumento do rendimento e automatização da reação de PCR. É uma técnica de fácil execução e mais rápida do que a PCR convencional (Heid et al., 1996; Mackay et al., 2002; Mackay, 2004; Arya et al., 2005; Espy et al., 2006). O preço do equipamento e dos reagentes utilizados nesta técnica são uma desvantagem.

Em geral, a PCR-RT utilizada na deteção e quantificação do DNA do HCMV é sensível, específica e reprodutível, reduzindo significativamente o tempo de execução e de análise dos resultados que pode ter impacto no diagnóstico e no tratamento dos pacientes (Hodinka, 2015, pp. 1722-1725). Esta técnica tem-se tornado o método de referência para a deteção do HCMV em muitos laboratórios de virologia, porque os resultados estão disponíveis em poucas horas, são mais sensíveis do que a cultura de células e possibilitam a quantificação do DNA o que permite o seguimento do doente no que diz respeito à eficácia da terapêutica (Mocarski, 2013, p. 2004).

1.9 Diagnóstico nos diferentes tipos de infeção

1.9.1 Diagnóstico na Mulher Grávida

O diagnóstico de infeção primária por HCMV durante a gravidez é importante, dado que a maior parte das infeções são assintomáticas e há maior risco de transmissão e de ocorrerem sequelas graves no feto. A serologia é o método mais utilizado para o diagnóstico destas infeções na grávida. Quando há seroconversão, isto é, as IgG de negativas passarem a positivas numa segunda amostra, poder-se-á dizer que estamos perante uma infeção primária. Esta é a forma mais simples e segura de realizar o diagnóstico de infeção primária na mulher grávida. Porém, a deteção da seroconversão só é possível quando há conhecimento do estado imunológico anterior o que nem sempre é possível devido à inexistência de um programa de rastreio universal (Revello and Gerna, 2002; Lazzarotto et al., 2008; Lazzarotto, 2010).

Quando não é possível a observação da seroconversão das IgG recorre-se à pesquisa de anticorpos IgM específicos para HCMV. Estes são bons indicadores de uma infeção ativa ou recente causada pelo vírus Citomegálico. No entanto, nem sempre podem ser correlacionados com uma infeção primária, uma vez que os anticorpos podem persistir, em algumas mulheres grávidas, durante 6 a 9 meses após o término da fase aguda da infeção primária. Estes anticorpos podem, ainda, ser produzidos e detetados durante infeções recorrentes, e podem ocorrer em indivíduos com infeções provocadas por outros vírus, tal como o *Epstein-Barr* e o *Parvovírus B19* ou doenças autoimunes. A presença da IgM funciona apenas como aviso de uma provável infeção aguda primária e é um ponto de partida para um estudo mais completo para determinar se existe risco de transmissão intrauterina. Devem então ser realizadas técnicas confirmatórias, nomeadamente a avidez das IgG ou *western-blot* para as IgM (Revello and Gerna, 2002; Lazzarotto et al., 2004; Lazzarotto et al., 2008; Lazzarotto, 2010).

O teste de avidez das IgG é a técnica mais utilizada e a que apresenta maior credibilidade para identificar uma infeção primária em mulheres grávidas, pois permite a diferenciação entre uma infeção primária e uma infeção recorrente e ajuda a perceber se estamos perante uma infeção primária numa mulher grávida sem histórico de seroconversão (Grangeot-Keros et al., 1997; Macé et al., 2004). Sabe-se que os anticorpos produzidos durante a resposta imune primária têm uma avidez muito menor do que os produzidos durante uma resposta não primária e o grau de avidez aumenta progressiva e lentamente, refletindo a maturação da resposta imunológica (Lazzarotto et al., 2008). Assim, baixos índices de avidez indicam infeção primária recente por HCMV, enquanto índices de avidez elevados indicam uma infeção antiga ou recorrente (Lazzarotto et al., 1997). Se for detetado um nível elevado de avidez durante as primeiras 12 a 16 semanas de gravidez pode ser considerado um bom indicador de uma infeção antiga (Lazzarotto et al., 2000b; Lazzarotto et al., 2008).

Métodos serológicos e de biologia molecular, como a detecção de DNA do vírus por PCR, podem ajudar no diagnóstico da infecção primária por HCMV em mulheres grávidas (Lazzarotto et al., 2008). Contudo, estes métodos não permitem estabelecer relação com o curso clínico da infecção, o risco de transmissão intrauterina e a gravidade da infecção congênita por HCMV. Estes métodos apresentam baixa sensibilidade na detecção da transmissão vertical do vírus em grávidas que adquiriram infecção primária entre a quarta e a 30ª semana de gravidez. Deste modo, o HCMV poderá não ser detectado no sangue materno quando uma infecção primária no momento do diagnóstico. Caso haja detecção do vírus não há associação a um maior risco de infecção e/ou dano fetal ou neonatal (Lazzarotto et al., 2004).

Relativamente ao diagnóstico de uma infecção recorrente por HCMV na mulher grávida ainda não estão validados métodos de diagnóstico (Leruez-Ville et al., 2017; Khalil et al., 2017).

1.9.2 Diagnóstico no feto

No caso de suspeita ou se for diagnosticada uma infecção primária pelo HCMV na mulher grávida, é importante realizar o diagnóstico pré-natal, com o objetivo de verificar o risco de transmissão vertical e as possíveis sequelas no feto (Guerra et al., 2000; Revello and Guerra, 2002). O diagnóstico pode ser realizado através de testes invasivos (amniocentese e cordocentese) e de exames não invasivos (ecografia e ressonância magnética) (Lazzarotto et al., 2011).

A ecografia tem a vantagem de ser um exame não invasivo que permite a observação de anomalias estruturais e/ou de crescimento característicos da infecção por HCMV (Lazzarotto et al., 2014). Podem ser observadas alterações como o aumento da espessura da placenta, geralmente com aspeto heterogêneo e calcificações, assim como, atraso do crescimento intrauterino. Também podem ser encontradas, em fetos infetados congenitamente, lesões cerebrais, como ventriculomegalia, microcefalia, hepatoesplenomegalia, ascite, derrame pleural, cardiomegalia, calcificações intracranianas e hepáticas, hidropsia fetal e entre outras (Benoist et al., 2008b; Yinon et al., 2010). Contudo, a sensibilidade é baixa e apenas identifica 20% dos fetos infetados. Por outro lado, podem ocorrer fetos infetados que no momento da ecografia não apresentam alterações ecográficas e outras podem ser transitórias (Benoist et al., 2008b; Guerra et al., 2008). A ausência de lesões pode tranquilizar a mulher grávida, mas não rejeita a possibilidade de se tratar de uma infecção congênita e neste caso é necessário manter a vigilância às alterações acima referidas, realizando ecografias mensalmente, dado que estas podem surgir ao longo da gravidez e ajudam no prognóstico da infecção no feto (Guerra et al., 2000; Agrawal and Gilham, 2009; Bonalumi et al., 2011).

A ressonância magnética (RM) é normalmente realizada para detecção de alterações no feto, utilizada como técnica complementar à ecografia, visto que pode fornecer informações adicionais em relação a alterações cerebrais, principalmente no sistema nervoso central. O uso destas duas técnicas em conjunto, aumenta o valor preditivo positivo para lesões cerebrais confirmadas e a sensibilidade da RM aumenta com o avanço da

gestação, por isso deve ser realizado no terceiro trimestre, entre a 32ª e 34ª semana e pode melhorar a avaliação do prognóstico, sobretudo quando detetadas lesões cerebrais na ecografia (Benoist et al., 2008b; Picone et al., 2008; Coll et al., 2009; Walker et al., 2013).

O diagnóstico de infeção congénita por HCMV no feto pode ser realizado através do isolamento do vírus por cultura celular ou da amplificação do genoma viral por PCR no líquido amniótico (LA), obtido por amniocentese (Benoist et al., 2008a). A deteção do HCMV no LA é o método *standard* para o diagnóstico pré-natal (Ross et al., 2011). A amniocentese deve ser efetuada após a 21ª-22ª semana de gestação isto para garantir que a diurese do rim do feto esteja bem estabelecida. No caso de infeção, o feto começa a excretar o vírus na urina e como o HCMV tem uma replicação lenta, são necessárias 6 a 9 semanas após a infeção primária materna para o vírus ser excretado na urina do feto em quantidade suficiente para ser detetado no LA (Guerra et al., 2000; Lazzarotto et al., 2000b; Benoist et al., 2008a; Khalil et al., 2017). Resultados falsos negativos são comuns quando a amniocentese é realizada antes da 21ª semana de gestação, a sensibilidade pode rondar os 45% (Lazzarotto et al., 2008; Lazzarotto, 2010; Rawlinson et al., 2017). O isolamento viral no LA através de cultura celular tradicional pode indicar uma infeção no feto, e apresenta uma sensibilidade entre 50 a 80% e uma especificidade de 98 a 100%. No entanto, são necessários 14 dias para obter os resultados, o que é uma desvantagem (Benoist et al., 2008a). O método tradicional tem sido substituído pelo método *Shell-vial*, que permite resultados mais rápidos (Gleaves et al., 1985), como descrito no ponto “1.8.3. Cultura Celular”, enquanto a deteção do DNA viral por PCR no LA é uma técnica mais sensível, entre 50 e os 100%, e uma especificidade de 67 a 100%. A sensibilidade da PCR pode variar quando não é respeitado os tempos de colheita do LA ou em resultado da técnica de PCR utilizada, PCR convencional, *nested*-PCR ou PCR-RT. Um resultado falso-positivo pode ser justificado por contaminação do LA por sangue materno durante a amniocentese, se houver presença de virémia na grávida no momento da colheita ou contaminação do LA no procedimento laboratorial. A PCR-RT tem vindo a diminuir estes riscos de contaminação (Benoist et al., 2008a). Se ambas as técnicas obtiverem um resultado negativo, os clínicos podem excluir infeção fetal com elevado grau de certeza, o que pode desencorajar os pais a pôr termo à gravidez e a tranquilizar a mulher grávida (Guerra et al., 2000; Lazzarotto et al., 2008). Perante um resultado positivo, é recomendada a quantificação do DNA por PCR em amostras de LA, de modo a avaliar o risco do feto desenvolver infeção ou doença (Lazzarotto et al., 2000a). Existem estudos que relataram que cargas virais elevadas podem ser significativas de infeção sintomática no feto ou no RN; outros relataram que a carga viral poderá estar relacionada com a idade gestacional no momento da amniocentese ou com o tempo decorrido desde a infeção materna pelo HCMV. Serão necessários mais estudos para constatar o significado da concentração do DNA do vírus no LA (Yinon et al., 2010; Ross et al., 2011).

A infeção congénita no feto também pode ser diagnosticada através do sangue fetal do cordão umbilical, obtido por cordocentese. Métodos como a serologia, cultura celular (tradicional e *Shell-vial*) e PCR podem ser utilizados no diagnóstico, e são métodos altamente específicos (85-100%). Quanto à sensibilidade, a

cultura celular *Shell-Vial* apresenta baixa sensibilidade, ronda os 16%, a sensibilidade da serologia varia entre os 51 e 84%, a PCR é o método mais sensível (41 e 93%). A cordocentese é uma técnica invasiva e a colheita do sangue fetal é tecnicamente mais difícil do que a do LA e requer pessoal qualificado. Esta técnica está associada a um risco de perda fetal de 0,5 a 3% dos casos, superior à amniocentese, deste modo não é recomendada para a realização do diagnóstico pré-natal, a não ser que haja suspeita de infecção congénita por HCMV ou para comparação com resultados obtidos na amniocentese. Para além disso, a sensibilidade da técnica quando utilizado sangue fetal é mais baixa comparativamente com a do LA. Portanto, é aconselhável recorrer à cordocentese para esclarecer o prognóstico, não sendo indicada para o diagnóstico pré-natal (Benoist et al., 2008a; Malma and Engman, 2007; Coll et al., 2009).

Independentemente da técnica utilizada para o diagnóstico pré-natal, este deve ser confirmado à nascença, como explicado no ponto “1.9.3. Diagnóstico no Recém-nascido” (Benoist et al., 2008a).

1.9.3 Diagnóstico no Recém-nascido

O diagnóstico pós-natal consiste na deteção do vírus nas primeiras duas a três semanas de vida, para distinguir infecção congénita de infecção pós-natal, a partir de amostras de saliva e/ou urina, visto que o recém-nascido (RN) excreta o vírus em grandes quantidades durante meses (Rawlinson, 1999; Revello and Gerna, 2002; Benoist et al., 2008a). A colheita das amostras de urina é realizada recorrendo a sacos coletores estéreis, tratando-se de um método evasivo. Embora seja o produto biológico mais utilizado para a confirmação de infecção congénita por HCMV, existem dificuldades inerentes associadas a este método de colheita em RN, tais como irritação cutânea e no períneo, devido à necessidade de colar o saco coletor à volta dos órgãos genitais. É um processo de colheita que pode ser demorado devido a diurese inadequada, sendo necessário a substituição do saco coletor a cada 30 minutos, pode ocorrer vazamento da amostra e consequente perda da urina, está sujeito a taxa de contaminação elevada, geralmente por fezes, sendo necessária uma nova colheita de urina, ou seja, repetição de todo o processo de colheita (Al-Orifi et al., 2000; Waters et al., 2014; Cardoso et al., 2015; Ross et al., 2015). Amostras de saliva são mais fáceis de colher, não sendo necessário a utilização do saco coletor, a colheita é menos dispendiosa e a sensibilidade é semelhante à da amostra de urina. No entanto, pode haver resultados falsos-positivos, pois a saliva do RN pode estar contaminada com HCMV, isto porque o vírus está presente no leite materno alguns dias após o parto. De modo a evitar falsos-positivos, a saliva deve ser colhida imediatamente antes ou pelo menos uma hora após a amamentação. Um resultado positivo deve ser sempre confirmado através da urina, esta, colhida nas primeiras três semanas após o nascimento (Balcarek et al., 1993; Yamamoto et al., 2006; Boppana et al., 2011; Koyano et al., 2013; Luck et al., 2017; Rawlinson et al., 2017; CDC, 2020). Ao quantificar a carga viral do HCMV é possível correlacionar com o prognóstico (Adler and Marshall, 2007).

O método de referência para o diagnóstico de infecção congénita no recém-nascido (RN) é o isolamento do HCMV por cultura celular, visto ser um método sensível e específico (Rawlinson, 1999; Revello and Gerna,

2002; Benoist et al., 2008a; Fowler and Boppana, 2018). Como referido no ponto “1.8.3. Cultura Celular”, a técnica apresenta algumas limitações e tem vindo a ser substituída por métodos de biologia molecular, como a PCR-RT, dado que esta apresenta algumas vantagens como a elevada sensibilidade e especificidade, rapidez e menor custo. As condições de armazenamento e transporte não afetam tanto a técnica, podendo as amostras ser congeladas, e apresenta menor probabilidade de contaminação, por comparação com a PCR clássica, permitindo a automatização (Revello and Gerna, 2002; Boppana, 2011; Marsico and Kimberlin, 2017). Se um dos testes ou ambos forem negativos, considera-se que o RN não está perante uma infeção congénita por HCMV e não é necessária a realização de mais testes (Lazzarotto, 2010).

Métodos serológicos também podem ser utilizados para a realização do diagnóstico da infeção congénita por HCMV. A deteção da IgM no sangue do RN nas primeiras semanas de vida é indicativa de infeção adquirida durante a gravidez, no entanto, apenas 70% dos infetados apresentam este anticorpo ao nascimento, enquanto anticorpos IgG presentes no RN são maioritariamente transferidos pela mãe. É uma técnica pouco confiável, com baixa sensibilidade e especificidade e portanto não permite confirmar ou rejeitar a hipótese de uma infeção congénita por HCMV no RN, não sendo por isso adequados para o diagnóstico no RN. Quando a IgM é detetada no RN, o diagnóstico deve ser confirmado através das técnicas acima mencionadas (Revello, 1999; Ross and Boppana, 2005; Malm and Engman, 2007).

O método de antigenémia, ou seja, deteção da proteína pp65 em leucócitos no sangue periférico, apesar de ser rápido e simples de executar, não foi avaliado para o diagnóstico de infeção congénita por HCMV (Revello, 1999; Ross and Boppana, 2005).

Todos os RN infetados congenitamente devem ser acompanhados clinicamente, no primeiro, terceiro, 6º e 12º mês de vida, e posteriormente uma vez por ano até à idade escolar, para identificar sequelas com início tardio. O acompanhamento deve incluir: avaliação física, neurológica e antropométrica; avaliação do neurodesenvolvimento; exames oftalmológicos; colheita de sangue para a realização de testes laboratoriais, como hemograma completo, contagem de plaquetas, níveis de transaminases e de bilirrubina (direta e indireta) e, por fim colheita de urina para isolamento e quantificação do HCMV através da PCR-RT (Coll et al., 2009; Lazzarotto, 2010; Rawlinson et al., 2017).

Duas ou três semanas após o nascimento, é possível realizar o diagnóstico tardio de infeção congénita por HCMV e distingui-la de uma infeção perinatal, através da deteção do DNA do HCMV por PCR em amostras de sangue seco conservadas em papel de filtro, os chamados cartões de diagnóstico precoce, também conhecidos como *guthrie cards*. Estas amostras são rotineiramente colhidas nos primeiros dias de vida do RN, para fins de pesquisa de doenças metabólicas e genéticas e permite avaliar se a infeção por HCMV foi adquirida por via intrauterina (Barbi et al., 1996). As amostras de saliva e urina colhidas após este período são suscetíveis a resultados falsos-positivos, pois pode tratar-se de uma infeção adquirida no momento do parto, em consequência do contacto com secreções vaginais ou, após por contaminação através do leite

materno ou por transfusão (Barbi et al., 2000). A PCR apresenta 93% a 100% de sensibilidade e especificidade de 99-100%, quando comparada com a técnica de referência, a cultura (Barbi et al., 2000; Paixão et al., 2009). Por esta razão, quando é obtido um resultado positivo é confirmada uma infecção congénita por HCMV no RN, enquanto um resultado negativo exclui esta hipótese e pode indicar que se trata de uma infecção perinatal (Barbi et al., 2006). A realização deste diagnóstico é importante, pois permite a monitorização do RN, observar e corrigir sequelas e instituir medidas terapêuticas (Barbi et al., 2000).

1.10 Rastreio

A infecção congénita pelo HCMV é um problema de saúde pública, com um elevado impacto económico para a sociedade, visto que as crianças infetadas podem desenvolver sequelas tardias graves e, implicando a necessidade de cuidados especiais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a implementação de um rastreio deve seguir alguns critérios e a infecção congénita por HCMV satisfaz estes critérios, pelo que seria, importante a implementação de um rastreio universal, dado que a maioria das crianças infetadas é assintomática na altura do nascimento.

A implementação do rastreio é assunto de debate há vários anos, não havendo, no entanto, nenhum consenso em torno desta questão (Wilson and Jungner, 1968; Dollard et al., 2010; Yinon et al., 2010; Hilditch et al., 2018). O rastreio universal não se destina ao diagnóstico de infeções sintomáticas, pelo contrário, estes casos devem ser encaminhados para realizarem o diagnóstico confirmatório e se necessário o tratamento (Wilson and Jungner, 1968; Grosse et al., 2009). A implementação de um rastreio para infecção congénita pelo HCMV tem como objetivo a deteção de crianças com infecção congénita que nascem assintomáticas por isso traria diversos benefícios, permitiria a deteção precoce destas crianças, identificaria o risco de virem a desenvolver sequelas, como a perda auditiva leve ou unilateral que, de outra forma, poderiam permanecer sem diagnóstico até a idade escolar e permitiria, ainda, a intervenção precoce, monitorização e respetivo tratamento. Foi estabelecido que, crianças diagnosticadas precocemente com perda auditiva desenvolvem melhor a linguagem e expressiva com função cognitiva melhorada do que crianças com diagnóstico tardio (Grosse et al., 2009; Cannon et al., 2014; Rawlinson et al., 2017).

Há vários métodos disponíveis para diagnosticar infeções por HCMV nos RN (ponto “1.9.3 Diagnóstico no Recém-nascido”). O método deve ter como prioridade uma elevada sensibilidade e especificidade, devem ser considerados os custos associados e se é um método capaz de ser utilizado em larga escala. A escolha da amostra é um ponto importante, deve ser de fácil obtenção, fácil transporte para o laboratório, dado que um rastreio implica um elevado número de amostras. Amostras de sangue, urina ou saliva podem ser utilizadas (Barbi et al., 2006; Grosse et al., 2009; Ross et al., 2014).

O isolamento do HCMV por cultura celular mas não é o ideal para o rastreio devido às desvantagens referidas anteriormente no ponto “1.8.3. Cultura Celular”. Os testes de biologia molecular, como a PCR, tem sido

proposta a sua utilização para o rastreio, pois apresenta algumas vantagens quando comparada com o isolamento viral (Barbi et al., 2006; Ross et al., 2014).

O rastreio poderia ser realizado a partir da amplificação por PCR do DNA viral, extraído de amostras de sangue seco nos *Guthrie cards*. Estas amostras são rotineiramente colhidas em RN para outros fins, logo tem a vantagem de não ser necessário outra colheita e poderem ser enviadas para o laboratório por correio (Barbi et al., 2000; Barbi et al., 2006). A técnica de PCR-RT em *Guthrie cards* foi testada para identificar RN com infecção congénita por HCMV e apresentou baixa sensibilidade, o que se torna uma limitação para a sua implementação num rastreio (Boppana et al., 2010). Binda e seus colaboradores testaram *pools*, ou seja, juntaram três *Guthrie cards* e analisaram-nos através da *nested*-PCR, tendo concluído que este método pode diagnosticar com precisão a infecção congénita por HCMV e consegue reduzir o custo nos consumíveis, tanto de colheita como do teste (Binda et al., 2004).

Como os RN infetados excretam maior carga viral em amostras de saliva e urina do que no sangue, estes produtos biológicos são mais adequados para a deteção do DNA viral (Balcarek et al., 1993). Já existem alguns estudos onde foram testadas amostras de urina e saliva. Como referido no ponto “1.9.3. Diagnóstico no Recém-nascido”, a urina é a amostra mais utilizada no diagnóstico de infecção congénita por HCMV no RN. Paixão e colaboradores desenvolveram a metodologia de *pools* para detetar este tipo de infeções, recorrendo a amostras de urina de RN, utilizando uma técnica de biologia molecular. Este estudo conseguiu diminuir substancialmente a mão-de-obra e o custo da deteção, dado que já não necessita de realizar um teste de diagnóstico para cada RN, uma vez que a carga viral na urina do RN é muito elevada e assim a realização de *pools* não afeta a sensibilidade da deteção. De facto, foi demonstrado que com esta metodologia é possível detetar uma amostra de urina positiva mesmo que diluída em 19 urinas negativas. Tanto a técnica de *nested*-PCR como a PCR-RT mostraram excelente correlação com o método padrão, a cultura celular. A utilização de *pools* de urina é uma possibilidade para a implementação do rastreio neonatal (Paixão et al., 2005; Paixão et al., 2012). No entanto, como a colheita de urina nos RN apresenta algumas desvantagens (ponto “1.9.3. Diagnóstico de infecção no Recém-nascido”) tem vindo a ser estudada a possibilidade de se utilizar amostras de saliva no rastreio de infeções congénitas por HCMV. Estas apresentam sensibilidade e especificidade semelhantes, a colheita é mais fácil e rápida do que as amostras de urina e menos sujeita a contaminações, tornando um procedimento menos desconfortável tanto para o RN como para os pais. Na literatura vários estudos demonstraram que a amostra de saliva é adequada para a implementação de um rastreio, em larga escala, para infecção congénita por HCMV (Yamamoto et al., 2006; Boppana et al., 2011; Barkai et al., 2014; Ross et al., 2014; Kadambari et al., 2015; Fowler and Boppana, 2018). A equipa de Waters relatou resultados promissores recorrendo a *pools* de amostras de saliva para deteção de HCMV (Waters et al., 2014). No entanto, devido a alguns resultados falso-positivos com saliva, essa abordagem deve ser usada como método de triagem e todas as amostras de saliva positivas devem ser

confirmadas por uma amostra de urina colhida nas duas primeiras semanas de vida (Eventov-Friedman et al., 2019; Exler et al., 2019).

Uma análise de custo-benefício relatou que os custos associados ao rastreio e posterior tratamento no RN era mais baixo do que outros programas para rastreio da infecção em RN (Williams et al., 2015). Foi também realizada uma análise de custo-efetividade baseada em dados derivados de grandes coortes prospectivas (*large prospective cohorts*) mostrando que o rastreio universal de infecção pelo HCMV no RN poderia reduzir os custos (Gantt et al., 2016). A redução substancial dos custos associados ao rastreio pode ser a solução para a sua implementação.

Também tem sido estudada a possibilidade de realizar o rastreio para infecção congénita em mulheres grávidas. Cahill e colaboradores realizaram um estudo, em 2009, no sentido de averiguar a possibilidade da implementação de um rastreio universal para infecção primária por HCMV em mulheres grávidas. Este englobou três populações: as mulheres antes ou no início da gravidez, de modo a identificar o estado serológico e prever o risco de adquirir infecção primária e possível transmissão ao feto, no caso de mulheres seronegativas é possível transmitir informação sobre o HCMV e aconselhar sobre medidas de prevenção, como as práticas de higiene, com o objetivo de minimizar a aquisição do vírus na gravidez. Outro grupo é o das mulheres com elevado risco de adquirir o HCMV, ou seja, mulheres que estejam em contacto com crianças com menos de três anos de idade, tanto em casa como em infantários; e por último o grupo das mulheres grávidas de 20 semanas que realizaram a serologia e respetivo teste da avidez, a fim de identificar uma infecção primária e o risco de infecção, dado que este é maior neste período de gestação. Esta equipa realizou uma análise de custo-efetividade e concluiu que o rastreio universal para infecção primária por HCMV em mulheres grávidas apresenta melhor custo-eficácia quando comparado com a administração de HIG-HCMV. Apesar desta conclusão, devem ser realizados estudos adicionais para avaliar a eficácia do tratamento com HIG-HCMV (Cahill et al., 2009; Walker et al., 2013).

O principal benefício do rastreio na mulher grávida é que este pode basear-se em programas de rastreio já existentes e estabelecidos na maioria dos países, sendo geralmente realizado antes ou no início da gravidez. Contudo, o rastreio na gravidez não é recomendado, pois apresenta algumas limitações, tais como as mulheres suscetíveis para o HCMV necessitarem de repetições do teste ao longo da gravidez, levando a um aumento de custos; aumenta a ansiedade dos pais; implica que sejam realizados métodos de diagnóstico invasivos; por vezes leva a interrupção involuntária da gravidez de fetos não infetados. Por outro lado, a ausência de vacina, tratamento e medidas preventivas eficazes, entre outras, são razões que limitam a implementação deste tipo de rastreio (Barbi et al., 2006; Waters et al., 2014; Vailloup-Fellous, 2009; Vide Tavares et al., 2011; Waters et al., 2014). Enquanto não houver uma vacina ou um tratamento pré-natal eficaz, é difícil justificar a realização da serologia em todas as mulheres grávidas em termos de custo-efetividade, daí não ser aconselhado a implementação do rastreio (Yinon et al., 2010).

1.11 Tratamento

O uso de antivirais contra o HCMV é majoritariamente utilizado para tratamento ou prevenção da infecção por HCMV em indivíduos imunocomprometidos. Nos últimos anos tem vindo a ser estudada a opção de recorrer à terapêutica antiviral no tratamento de RN infetados congenitamente e sintomáticos, dado que desenvolvem sequelas neurológicas com elevada frequência (Nagano and Morioka, 2019).

Geralmente, em pacientes imunocompetentes o tratamento para a infecção por HCMV não é recomendado, pois trata-se de uma infecção autolimitada, ou seja, normalmente é assintomática mas mesmo quando é sintomática desaparece sem deixar sequelas, pelo que não é necessário recorrer à terapêutica (Nangle et al., 2018).

Atualmente, o Ganciclovir, Valganciclovir, Cidofovir e Foscarnet são os principais antivirais utilizados no tratamento de infeções por HCMV nos vários contextos clínicos (Nasseta et al., 2009).

1.11.1 Tratamento na mulher grávida

A terapia antiviral pré-natal visa a prevenção da transmissão fetal da infecção por HCMV e, caso ocorra, para reduzir o risco e a gravidade das sequelas (Rawlinson et al., 2017). O tratamento antiviral em mulheres grávidas não é aconselhado, dado que alguns estudos mostraram efeitos teratogénicos em animais (Faqi et al., 1997). O tratamento intrauterino poderá ser uma alternativa à interrupção voluntária da gravidez, decisão frequentemente tomada pelas mulheres grávidas quando existem sinais de que o feto está infetado pelo vírus e/ou são detetadas anomalias quer através de ecografias ou RM (Jacquemard et al., 2007; Lazzarotto, 2010).

Relativamente aos antivirais, o Ganciclovir não é recomendado durante a gravidez devido ao risco de disgenesia gonadal verificada em animais e à incapacidade de monitorizar a toxicidade fetal, incluindo a neutropenia (Rawlinson et al., 2017). Em 2007, a equipa de Jacquemard apresentou resultados promissores no estudo que realizou em 20 mulheres grávidas com primoinfecção por HCMV e em que todos os fetos apresentavam infecção fetal confirmada (PCR positivo para HCMV no LA) e eram sintomáticos. Neste estudo foi efetuada a administração oral de 8 g/dia (2 gramas, 4 vezes ao dia) de Valaciclovir, até ao fim da gestação. Nos testes realizados na primeira e 12ª semana verificou-se que o fármaco foi bem tolerado e que houve redução significativa da carga viral no sangue fetal. O estudo não permitiu avaliar as sequelas que os fetos poderiam vir a desenvolver após o nascimento, devido ao pequeno número de grávidas tratadas (Jacquemard et al., 2007). Mais tarde, outro estudo foi realizado com o mesmo objetivo, a população alvo foram 41 mulheres grávidas com 43 fetos com infecção fetal por HCMV confirmada, o tratamento foi igualmente com 8 g/dia de Valaciclovir oral. Este estudo sugeriu a eficácia do tratamento, pois mostrou um aumento do número de RN assintomáticos de 43% para 82%, sem que tivessem sido detetados efeitos adversos notáveis e o fármaco foi bem tolerado pelas grávidas. Embora os resultados pareçam promissores, não são conclusivos

devido ao desenho de estudo, pois não se tratou de um estudo controlado e randomizado e o número de mulheres tratadas foi baixo (Leruez-Ville et al., 2016). Apesar dos resultados promissores obtidos em ambos os estudos, este fármaco não deve ser usado rotineiramente, visto que ainda não existem dados suficientes sobre a sua segurança e a sua eficácia antiviral durante a gestação (Rawlinson et al., 2017).

O Cidofovir e o Foscarnet também não são recomendados no tratamento de infecção por HCMV na mulher grávida porque são nefrotóxicos, potencialmente carcinogénicos e não existe informação suficiente sobre a sua segurança e sua eficácia (Rawlinson et al., 2016).

A administração de HIG-HCMV por via intravenosa tem vindo a ser estudada como outra possibilidade de tratamento em mulheres grávidas com infecção primária. Este tratamento tem como objetivo reduzir a doença fetal por infecção congénita por HCMV. Alguns estudos avaliaram a eficácia terapêutica deste tratamento após ser diagnosticada infecção fetal através da deteção de HCMV no LA (Nigro et al., 2005; Buxmann et al., 2012; Visentin et al., 2012; Revello et al., 2014). Nigro e colaboradores verificaram que houve uma redução significativa do número de bebés sintomáticos à nascença, isto é, a taxa de RN sintomáticos no grupo tratado era de 3% *versus* 50% no grupo não tratado (Nigro et al., 2005). Num estudo, envolvendo 42 mulheres com infecção primária por HCMV e 43 crianças, relatou que três RN cujas mães estavam inseridas no grupo de tratamento, permaneceram positivas para o HCMV mas foram assintomáticas ao nascimento e durante o acompanhamento no primeiro ano de vida e uma criança apresentou infecção sintomática *in* útero, ao nascimento e durante o período de acompanhamento (Buxmann et al., 2012). Noutro estudo, a equipa de Visentin relatou que 13% dos fetos infetados congenitamente por HCMV, de mães tratadas com HIG-HCMV apresentaram sequelas no primeiro ano de vida, como a surdez neurosensorial (Visentin et al., 2012). Em 2014, Revello e a sua equipa realizaram um estudo semelhante ao de Nigro *et al.*, mas com seleção aleatória dos participantes e controlado por placebo, tendo demonstrado que 11% dos fetos das mulheres tratadas com HIG-HCMV a cada quatro semanas apresentaram sequelas transitórias ou permanentes, em comparação com 16% dos fetos no grupo placebo, mostrando que não houve uma diferença significativa entre os grupos (Revello et al., 2014).

Como não existem evidências suficientes sobre a eficácia, a administração de HIG-HCMV não deve ser recomendada para tratamento de infecção fetal por HCMV (Rawlinson et al., 2016).

1.11.2 Tratamento no Recém-nascido

Atualmente existem dois fármacos disponíveis para o tratamento de infeções congénitas por HCMV em RN, o Ganciclovir e o seu pró fármaco Valganciclovir (Nasseta et al., 2009; Baquero-Artigao et al., 2009).

Em 2003, Kimberlin e colaboradores realizaram um estudo para avaliar a eficácia e segurança do tratamento com Ganciclovir em RN com infecção congénita sintomática por HCMV envolvendo sequelas no SNC, como microcefalia, calcificações intracranianas, líquido cefalorraquidiano anormal, coriorretinite e/ou défices

auditivos. As infecções congênitas foram confirmadas através do isolamento do vírus a partir de uma amostra de urina, durante o primeiro mês de vida. Aos RN que pertenceram ao grupo de tratamento com o Ganciclovir foram administrados 6 mg/kg/dose por via intravenosa a cada 12 horas, durante 6 semanas. Este estudo, demonstrou que, a terapia com Ganciclovir melhora o prognóstico auditivo e neurológico aos 6 e aos 12 meses, verificou-se que em 84% dos RN tratados, a audição melhorou ou estabilizou em comparação com 59% do grupo não tratado. Nenhum dos RN submetidos a tratamento apresentou agravamento na audição desde o início do tratamento até aos 6 meses, enquanto no grupo placebo, 41% dos RN apresentaram agravamento na audição. Por fim, para além do primeiro ano, 21% dos RN tratados demonstraram agravamento na audição desde o início da terapia, comparado com 68% no grupo sem tratamento. Relativamente à toxicidade do Ganciclovir, cerca de 63% dos sujeitos ao tratamento desenvolveram neutropenia moderada a grave, pelo que é recomendado a RN e/ou menores, a realização de um hemograma semanal durante o tratamento, mediante os valores obtidos pode ser necessário suspender o tratamento (Kimberlin et al., 2003). Outro estudo avaliou o impacto do desenvolvimento neurológico em crianças, com infecção congénita sintomática por HCMV envolvendo o SNC, quando submetidas ao tratamento com Ganciclovir, iniciado no primeiro mês de vida e durante 6 semanas. Este estudo demonstrou menos sequelas neurológicas aos 6 e 12 meses no grupo tratado com Ganciclovir (Oliver et al., 2009). As desvantagens do tratamento com o Ganciclovir são, o fármaco apresenta baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral (Whitley, 2012), a neutropenia desenvolvida, e os riscos associados à administração por via intravenosa, desta forma era desejável uma alternativa mais segura e simples (Kadambari et al., 2011).

O Valganciclovir é pró-fármaco oral do Ganciclovir, e a sua biodisponibilidade oral é maior, comparando com o Ganciclovir, pelo que tem a vantagem de não ser necessário a manutenção de um acesso intravenoso e o internamento hospitalar durante o tratamento. Este fármaco tem sido estudado para o tratamento de RN com infecção congénita sintomática por HCMV. Kimberlin e a sua equipa realizaram um estudo farmacocinético e farmacodinâmico onde avaliaram o tratamento com Valganciclovir oral em RN com infecção congénita sintomática por HCMV confirmada, durante 6 semanas de tratamento. Demonstraram que 16 mg/kg de Valganciclovir oral é o equivalente a 6 mg/kg de Ganciclovir intravenoso. A toxicidade do Valganciclovir é semelhante à do Ganciclovir, 38% das crianças tratadas desenvolveram neutropenia moderada a grave (Kimberlin et al., 2008). Em 2015, a mesma equipa realizou outro estudo, onde comparou os resultados do tratamento com Valganciclovir durante 6 semanas e 6 meses, em RN com infecção congénita sintomática por HCMV, com ou sem envolvimento no SNC. RN que receberam o tratamento durante 6 meses tiveram melhorias na audição a curto prazo semelhantes aos que o receberam durante 6 semanas. Porém, RN tratados durante 6 meses mostraram melhorias na audição e no desenvolvimento neurológico ao fim de 12 e 24 meses, ou seja, a longo prazo. O desenvolvimento de neutropénia não diferiu entre o grupo de RN que receberam o tratamento durante 6 semanas e o de 6 meses (Kimberlin et al., 2015). Com base nestes resultados, o tratamento em RN infetados congenitamente por HCMV e sintomáticos com Valganciclovir

durante 6 meses é considerada uma opção terapêutica eficaz e bem tolerada, melhorando a audição e o desenvolvimento neurológico a longo prazo (Marsico and Kimberlin, 2017).

No início do tratamento antiviral, os pais ou representantes legais dos RN, devem ter o conhecimento sobre os benefícios e os potenciais riscos da terapia (Marsico and Kimberlin, 2017). Os RN sujeitos ao tratamento, devem ser monitorizados durante todo o período, para detetar os efeitos adversos causados pelos antivirais, podendo mesmo ser necessário suspender temporária ou permanentemente o tratamento (Kimberlin et al., 2003; Marsico and Kimberlin, 2017). Devem também ser acompanhados até aos 6 anos de idade com controlo audiológico regular e oftalmológico até aos 5 anos (Lim and Lyall, 2017).

Atualmente, o tratamento com antivirais em RN assintomáticos não está recomendado devido à falta de evidências sobre o benefício (Marsico and Kimberlin, 2017). O *International Congenital Cytomegalovirus Recommendations Group* recomenda: tratamento em RN com infeção congénita por HCMV confirmada, com sintomas moderados a graves; 16 mg/kg de Valganciclovir oral duas vezes por dia; iniciar o tratamento no primeiro mês de vida e não exceder 6 meses, de modo a melhorar a função auditiva ou o desenvolvimento neurológico; monitorizar o RN, com hemograma semanal durante 6 meses, na 8ª semana e depois uma vez por mês até ao fim do tratamento. Os RN em tratamento devem fazer consultas de acompanhamento (exame oftalmológico precoce, no início do tratamento e, em seguida, conforme indicação do especialista; teste auditivo a cada meio ano durante três anos e depois anualmente até aos 19 anos de idade; exame neurológico durante o primeiro ano de vida) (Nicloux et al., 2020).

1.12 Objetivos

O diagnóstico da infeção congénita por HCMV tem vindo a revelar-se de extrema importância devido às graves consequências que esta infeção causa nas crianças e ao elevado impacto socioeconómico para a sociedade.

Muitos estudos têm sido realizados no diagnóstico pré-natal, com o intuito de conhecer o estado serológico para o HCMV da mulher na idade fértil. Era muito importante que este estudo fosse inserido na panóplia de análises clínicas efetuadas quando uma mulher pensa engravidar ou na fase inicial da gravidez. No entanto, pelos motivos atrás apresentados, esta prática não é ainda universalmente recomendada.

Deste modo, o diagnóstico de infeção por HCMV no RN têm vindo a ganhar importância. A técnica de referência para esta deteção é o isolamento do vírus por cultura celular, porém é uma metodologia dispendiosa e morosa, pelo que tendo sido substituída por métodos de biologia molecular, como a PCR-RT, uma técnica sensível e específica.

Com intuito de minimizar os custos e o tempo de resposta, propusemo-nos elaborar um estudo que tem como finalidade comprovar que testar amostras de saliva, em *pools* de 10 amostras, não só, mantém a

sensibilidade, mas permite uma resposta muito mais económica. Esta metodologia foi baseada num estudo descrito anteriormente pela equipa de Paixão, em 2012, que utilizou *pools* de 20 amostras de urina para o diagnóstico da infeção congénita por HCMV em RN (Paixão et al., 2005; Paixão et al., 2012).

Assim sendo, o principal objetivo deste estudo foi validar a metodologia de *pools* de 10 amostras de salivas (cuja colheita é mais vantajosa que a urina, vantagens referenciadas no ponto “1.9.3 Diagnóstico no Recém-nascido”) para o diagnóstico de infeção congénita por HCMV utilizando técnicas de biologia molecular.

Como objetivos secundários, pretendeu-se avaliar se as técnicas de PCR-RT e de *nested*-PCR têm sensibilidades semelhantes na aplicação da metodologia proposta e ainda quantificar as salivas e *pools* positivas utilizando a técnica de PCR-RT e o primeiro padrão internacional para o HCMV (NIBSC).

Para a realização do estudo foram selecionadas duas populações diferentes, os RN e as crianças com idades entre um e os três anos.

2 Materiais e Métodos

Todo o trabalho realizado no laboratório da Unidade de Infecção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas da *Nova Medical School* | Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (NMS|FCM - UNL) foi executado segundo as normas de segurança instituídas no laboratório, de modo a prevenir possíveis contaminações que pudessem afetar os resultados.

Deste modo, foram consideradas algumas normas, como:

- Uso de equipamentos de proteção individual (batas e luvas descartáveis)
- Todo o material utilizado foi estéril, livre de DNA, RNA, DNases e RNases e de utilização única;
- Em todos os procedimentos de pipetagem utilizou-se pontas com filtro, livres de DNA, RNA, DNases e RNases e de utilização única;
- Antes de abrir tubos com amostra ou reagentes, agitou-se no vórtex e faz-se um *spin*, a fim de evitar salpicos de gotículas presentes na tampa dos tubos e posterior contaminação da bancada ou de outras amostras em estudo;
- Foram utilizadas áreas separadas para a realização dos diferentes protocolos:
 - Sala de cultura para o manuseamento dos tubos originais das amostras, preparação das *pools* e separação das amostras para a realização das diferentes técnicas;
 - Sala de extração para a extração do DNA das amostras;
 - Sala de reagentes para a preparação das misturas de reagentes para as reações de amplificação;
 - Sala de amplificação da PCR;
 - Sala de deteção para a visualização dos produtos de amplificação da *nested*-PCR.

A sala de reagentes e a sala de deteção têm material e equipamento dedicado e regras de utilização restritas.

Todos os produtos biológicos foram processados em câmaras de segurança biológica tipo II (Nuair, Biological Safety Cabinets, Class II), tendo sempre o cuidado de proceder à desinfeção do equipamento e do material com álcool a 70%, antes e depois da utilização.

- Na separação das amostras e preparação das *pools*, efetuada no laboratório de cultura, procedeu-se à desinfeção das luvas com lixívia diluída a 3%, entre cada amostra, da superfície da câmara e das micropipetas de 5 em 5 amostras, com álcool a 70%;
- A câmara de segurança biológica foi irradiada com radiação UV durante 20 minutos no fim de cada ciclo de trabalho.

2.1 Desenho de estudo

Como o principal objetivo do presente estudo era a validação da metodologia de *pools* de amostras de saliva para a deteção da infeção congénita por HCMV aplicando técnicas de biologia molecular o desenho de estudo experimental envolveu as seguintes fases:

- 1) Amostras biológicas: definição da população alvo, do material e procedimento de recolha, das condições de transporte e armazenamento;
- 2) Metodologia: definição das técnicas de biologia molecular a aplicar na deteção do DNA do HCMV;
- 3) Pré-teste: preparação e análise de amostras preparadas em laboratório (designadas amostras *spiking*);
- 4) Procedimento analítico: definição do fluxograma de trabalho analítico e de confirmação dos resultados (Figura 2.1).
- 5) Análise dos resultados: correlação entre as amostras de saliva individuais, *pool*/10 e *pool*/20 nas duas metodologias de biologia molecular seleccionadas;
- 6) Validação da metodologia em estudo.

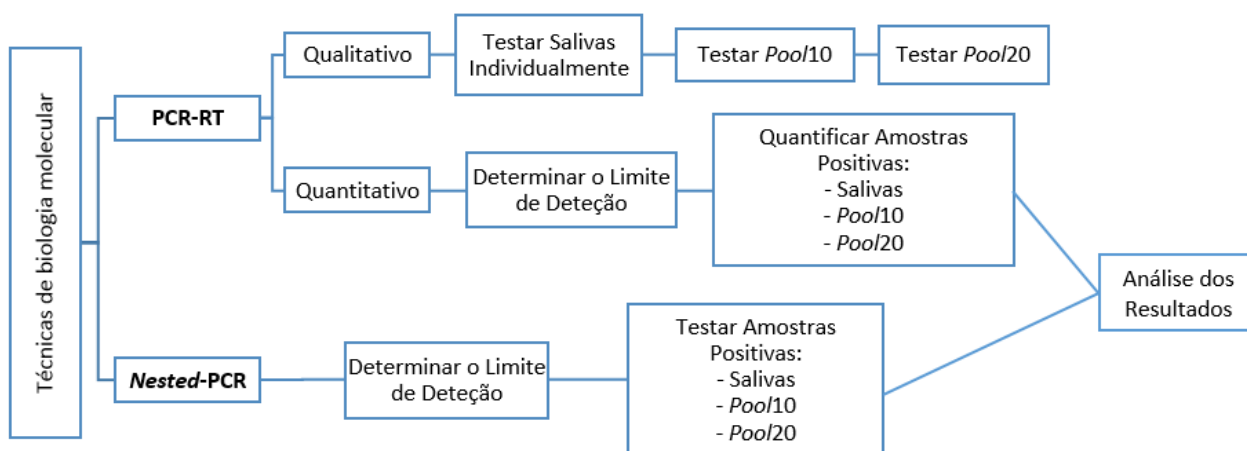


Figura 2.1 – Fluxograma do estudo.

2.2 População em estudo

Para a realização do estudo, a população alvo consistiu em dois grupos: recém-nascidos com menos de 10 dias, doravante designados de RN e crianças com idades compreendidas entre o 1 e os 3 anos (designados de CR), da Unidade de Neonatologia e da Urgência, do Serviço de Pediatria, do Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO). A recolha de amostras ocorreu entre 8 de novembro de 2018 e 16 de maio de 2019.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da FCM|NMS – UNL (CEFCM) e pela Comissão de Ética para a Saúde do CHLO (Anexo I e II, respetivamente) e todos os representantes legais das crianças que participaram neste estudo leram e assinaram um consentimento informado (Anexo III).

2.3 Amostras Biológicas

A amostra biológica utilizada neste estudo foi a saliva. Para a colheita das amostras de saliva foram utilizadas zaragatoas estéreis do tipo *Rayon* (FLmedical, Torreglia, Italy). Estas foram cuidadosamente introduzidas na cavidade oral das crianças durante aproximadamente 5 segundos e colocadas em tubos estéreis de 3 mL (Biosigma, Veneza, Itália) contendo 500 µL de meio de transporte RPMI 1640 (Life technologies, Paisley, UK). Estes tubos foram previamente preparados na sala de cultura do laboratório de microbiologia da FCM|NMS e enviados para os locais de colheita.

No caso da amostra de saliva ser positiva para DNA do HCMV, foi pedida uma amostra de urina para confirmação de infeção congénita por HCMV. Para a colheita foram utilizados sacos coletores de urina, posteriormente colocados em frascos estéreis de 5 mL.

As amostras foram devidamente acondicionadas a uma temperatura de 4 °C, até à realização do transporte para o laboratório de microbiologia associado à Unidade de Infeção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas da FCM|NMS. O transporte das amostras foi realizado num contentor refrigerado. A análise das salivas foi realizada num período máximo de uma semana após a colheita.

As amostras de saliva foram codificadas pela equipa que realizou as colheitas, por forma a garantir o anonimato do participante. Após a chegada ao laboratório as amostras foram identificadas de forma sequencial, com as iniciais “TD” (Tese Diagnóstico).

2.4 Processamento das amostras biológicas

No laboratório, os tubos de colheita com a zaragatoa foram agitados no vórtex, durante 5 a 10 segundos e centrifugados durante 5 minutos a 948 x g (Hettich Rotina 380 R), à temperatura ambiente. De seguida, pressionou-se a zaragatoa contra as paredes do tubo, de modo a retirar o máximo de volume de amostra, descartando-a. Transferiu-se 200 µL de amostra para um tubo *ependorf*, devidamente identificado, armazenando-o no frigorífico a 4 °C, para posterior extração do DNA viral. O restante volume foi transferido para um tubo de congelação, também devidamente identificado e congelado a -20 °C.

As amostras de urina após a chegada ao laboratório foram imediatamente divididas em várias alíquotas. Uma das alíquotas foi armazenada a 4 °C para extração de DNA, não excedendo as 24 horas e as restantes foram congeladas a -20 °C.

2.5 Amostras *Spiking*

Para aferir a capacidade da metodologia em estudo para identificar amostras positivas de diferentes concentrações foram testadas amostras *spiking* (SPK) obtidas através de uma matriz de amostras de saliva negativas para HCMV, previamente testadas por PCR-RT, às quais se adicionou diferentes concentrações de sobrenadante de uma cultura pura da estirpe AD169 (doravante designada de AD169). No total foram analisadas 4 diferentes SPK e para cada SPK foi realizada a respetiva *pool* de 10 amostras.

2.6 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras (*spiking*, saliva, *pool*10, *pool*20 e urinas) utilizou-se o *kit* comercial “PureLink® Genomic DNA Minikit” (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, com ligeiras alterações:

- Ligaou-se o termobloco (Grant Boekel) a 55°C;
- No tubo *ependorf* com os 200 µL de amostra (previamente preparado na fase de processamento das amostras biológicas, ponto “2.4 Procesamento das amostras biológicas”, adicionou-se 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise, agitou-se no vórtex entre a adição de cada reagente. Fez-se um *spin* (Eppendorf Minispin);
- Incubou-se a 55 °C, durante 10 minutos. Fez-se um *spin*;
- Adicionou-se 200 µL de etanol absoluto. Agitou-se de imediato no vórtex. Realizou-se novo *spin*;
- Colocou-se a coluna de extração num tubo coletor de 2 mL, ambos fornecidos pelo *kit*;
- Transferiu-se toda a mistura (\approx 620 µL) para a coluna de extração;
- Centrifugou-se a coluna a 10 000 x g (Hettich Mikro 22 B) durante 2 minutos, à TA;
- Descartou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna de extração num novo tubo coletor, fornecido pelo *kit*.
- Pipetou-se 500 µL de tampão de lavagem 1 para a coluna de extração;
- Centrifugou-se a 10 000 x g durante 2 minutos, à TA;
- Descartou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna de extração num novo tubo coletor, fornecido pelo *kit*;
- Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem 2;
- Centrifugou-se à velocidade máxima (17 000 x g,) à TA, durante 3 minutos;
- Descartou-se o tubo coletor;
- Colocou-se a coluna de extração num tubo *ependorf* estéril de 1,5 mL;
- Adicionou-se 50 µL de tampão de eluição à coluna de extração;
- Incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos;
- Centrifugou-se a coluna de extração à velocidade máxima (17 000 x g,) durante 3 minutos, à TA;

- Para recuperar uma maior quantidade de DNA no extrato, realizou-se uma segunda eluição utilizando os 50 µL de eluato, obtidos na primeira eluição;
- Incubou-se por mais 5 minutos à TA;
- Centrifugou-se a coluna de extração à TA e velocidade máxima (17.000 x g,) durante 3 minutos;
- Descartou-se a coluna de extração;
- Armazenar o extrato de DNA purificado a -20 °C até ser amplificado. No caso, de ser amplificado no mesmo dia, colocar no frigorífico, a 4 °C.

2.7 Técnicas de Biologia Molecular

Após a extração do DNA, procedeu-se à amplificação dos fragmentos de DNA recorrendo a duas técnicas de biologia molecular *in house*: PCR-RT e a *nested*-PCR.

2.7.1 PCR-RT

Para a realização da técnica PCR-RT seguiu-se o protocolo estabelecido no laboratório: foram utilizados *primers* e sonda específicos para a região do gene UL83 (283 pares de base), que codifica a fosfoproteína pp65 do genoma do HCMV. Foi utilizada uma sonda *TaqMan*[®], cuja extremidade 5' tinha o *Reporter* FAM e extremidade 3' o *Quencher* MGB. Na tabela 2.1 estão apresentadas as sequências dos *primers* e da sonda utilizados na técnica.

Tabela 2.1 – Sequência dos *primers* e sonda utilizados na técnica PCR-RT.

Primer Forward	5' CCCTCCGGCAAGCTCTTT 3'
Primer Reverse	5' CAGGTCCTCTTCCACGTCAGA 3'
Sonda <i>TaqMan</i>[®]	FAM 5' TGCACGTCACGCTGG 3' MGB

Na sala de reagentes preparou-se a mistura de reagentes para as reações de amplificação (*master-mix*): num tubo *ependorf* estéril de 1,5 mL dispensou-se os volumes de reagentes, apresentados na tabela 2.2, para um volume final de 20 µL.

Tabela 2.2 - Mistura de reagentes por reação de amplificação da técnica PCR-RT.

Reagentes	Concentração Final	Volume por reação
Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (BioLabs® Inc.)	1 X	10,0 µL
Primer Forward	4 µM	1,0 µL
Primer Reverse	4 µM	1,0 µL
Sonda TaqMan®	0,3 µM	0,75 µL
Água ultrapura livre de DNases e RNases		7,25 µL
Volume final da <i>master-mix</i> por reação		20 µL

Após a preparação da *master-mix* agitou-se o tubo *ependorf* no vórtex e fez-se um *spin*. Em seguida pipetou-se 20 µL da *master-mix* para cada poço de reação da placa de PCR de 96 poços (Sarstedt, Numbrecht, Germany), previamente definida. A placa de 96 poços foi transportada entre salas dentro de uma caixa específica, tapada e ao abrigo da luz, de modo a evitar a perda de fluorescência da sonda.

De seguida, na sala de cultura, foram adicionados 5 µL de extrato de DNA de cada uma das amostras aos 20 µL da *master-mix*, perfazendo um volume total da reação de 25 µL. Todas as amostras foram testadas em duplicado e para uma efetuou-se um controlo interno (CI), que consistiu na adição de 2 µL de um extrato de AD169, com concentração de $4,4 \times 10^6$ UI/mL, a 5 µL de amostra.

Em cada série de PCR-RT foi incluído um controlo negativo (CN), poço onde foi pipetado 5 µL de água ultrapura, um controlo positivo (CP), poço onde foi utilizado 5 µL de extrato de AD169, com concentração de $4,4 \times 10^5$ UI/mL, e um controlo do controlo interno (CCI), que consistiu na adição de 2 µL de extrato de AD169, com concentração de $4,4 \times 10^6$ UI/mL. O CN testou a presença de contaminação na série de PCR, o CP serviu para validar a série de PCR, no caso de ter um resultado negativo todo o ensaio seria considerado inválido e o CCI teve como objetivo o controlo do resultado de cada um dos CI das amostras. No caso do CI de cada amostra ser negativo ou com um valor superior a 2 CTs do CCI, seria indicativo da presença de inibidores na amostra. O procedimento a seguir seria tentar diluir esse inibidor de forma a permitir a amplificação de uma amostra positiva. Assim, diluir-se-ia a amostra a 1/10 e realizar-se-ia novamente a PCR-RT e o respetivo CI (Burkardt, 2000). No caso de ocorrer amplificação do CI, significava que o inibidor foi diluído o suficiente para que uma amostra positiva seja detetada. A persistir um resultado negativo no CI a amostra seria rejeitada.

Após a adição de todos os extratos aos poços em análise a placa foi selada com película transparente (Sealing Tape, optically clear, Sarstedt, Numbrecht, Germany), com o auxílio de um aplicador, de seguida centrifugada durante 5 minutos a $1\,481 \times g$ (Hettich Rotina 380 R). E por fim, foi colocada no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação (Figura 2.2):

- Desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos;
- Desnaturação a 95 °C durante 15 segundos – 40 ciclos;
- Hibridação/Extensão a 60 °C durante 1 minuto.

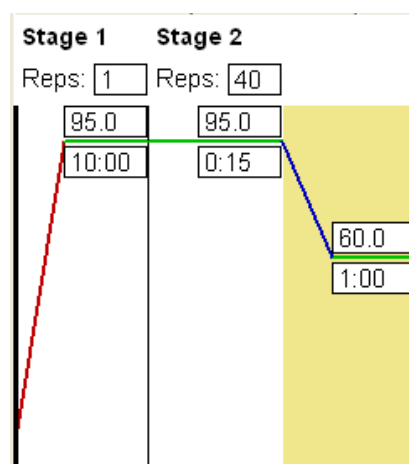


Figura 2.2 - Ciclo de amplificação da técnica PCR-RT.

Terminada a reação de amplificação e a recolha da fluorescência, na fase de *annealing* (temperatura de 60°C) a análise dos dados foi realizada pelo *software* do termociclador.

Para validação e interpretação dos resultados de amplificação foram considerados os seguintes critérios:

- A diferença entre os duplicados não diferir mais de 2 CTs;
- CT do CI da amostra e do CCI não ser superior a 2 CTs;
- Reação de amplificação positiva quando $15 \leq CT \leq 39$;
- Reação de amplificação considerada negativa quando o $CT > 39$.

2.7.1.1 Quantificação

O primeiro padrão internacional da OMS para o HCMV, NIBSC 09/162, para técnicas de amplificação de ácidos nucleicos de HCMV, foi utilizado na quantificação da carga viral presente nas amostras de saliva individuais, *pools* de amostras de saliva e amostras de urina positivas. Este padrão é constituído por uma suspensão da estirpe Merlin do vírus HCMV em tampão Tris-HCl e soro de albumina humana.

Após a reconstituição, segundo instruções do fabricante, a suspensão ficou com uma concentração inicial de 5×10^6 Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL) (designado de NIBSC inicial). Para a quantificação, foi construída uma curva padrão com 4 pontos, obtidos a partir de diluições seriadas de uma diluição a 1:10 do NIBSC inicial, com as seguintes concentrações: $1,25 \times 10^6$, $1,25 \times 10^5$, $1,25 \times 10^4$ e $1,25 \times 10^3$ UI/mL.

As concentrações das amostras em análise foram extrapoladas a partir da curva padrão obtida na mesma série de PCR-RT.

2.7.2 Nested-PCR

A técnica *nested*-PCR consiste na amplificação da região gp58 do genoma do HCMV (Wakefield et al., 1992), baseia-se em duas amplificações sucessivas, utilizando duas misturas, e dois pares de *primers* específicos (Tabela 2.3). Esta técnica foi realizada segundo o protocolo estabelecido no laboratório. No final obtém-se um fragmento de 100 pb.

Tabela 2. 3 - Sequência dos *primers* utilizados nas duas reações na técnica *nested*-PCR.

Primers externos	gB1	5' GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A 3'
	gB2	5' GTC GAC GT GGA GAT ACT GCT GAFG G 3'
Primers internos	gB3	5' ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG 3'
	gB4	5' TCA ATC TAG CGT TTG AAG AGG TA 3'

Para a primeira amplificação foi realizada uma *master-mix*, de acordo com a tabela 2.4. De seguida, foram pipetados 20 µL da *master-mix* para tubos de PCR de 0,2 µL.

Tabela 2.4 - Mistura de reagentes por reação da 1ª amplificação da técnica *nested*-PCR.

Reagentes	Concentração Final	Volume por reação
Tampão de PCR	1 X	2,5 µL
MgCl₂	1,5 µM	0,75 µL
dNTP's (dATP; dTTP; dCTP; dGTP)	0,2 µM	0,5 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen)	1 U/µL	0,2 µL
Primers externos (gB1; gB2)	0,25 µM	0,63 µL
Água ultrapura livre de DNases e RNases		14,8 µL
Volume final da <i>master-mix</i> por reação		20,0 µL

Na sala de cultura, aos 20 µL adicionou-se 5 µL de cada extrato de DNA, o que fez o volume final da reação de 25 µL. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador, com o seguinte programa de amplificação, no termociclador Biometra T Gradient 96 (Alfagene):

- Desnaturação durante 2 minutos a 94°C;
- 35 Ciclos:
 - Desnaturação a 94°C durante 30 segundos;
 - Hibridação a 55°C durante 30 segundos;
 - Extensão a 72°C durante 30 segundos;
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a 1ª amplificação, foi preparada uma nova *master-mix* de acordo com a tabela 2.5.

Tabela 2. 5 - Mistura de reagentes por reação da 2ª amplificação da técnica nested-PCR.

Reagentes	Concentração Final	Volume por reação
Tampão de PCR	1 X	2,5 µL
MgCl₂	1,5 µM	0,75 µL
dNTP's (dATP; dTTP; dCTP; dGTP)	0,2 µM	0,5 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen)	1 U/µL	0,2 µL
Primers internos (gB3; gB4)	0,5 µM	1,25 µL
Água ultrapura livre de DNases e RNases		16,5 µL
Volume final da <i>master-mix</i> por reação		23 µL

Ao volume final foi de 23 µL, foi adicionado 2 µL do amplificado obtido anteriormente na 1ª amplificação, o que fez um volume total da reação de 25 µL. Para a 2ª amplificação foi utilizado o seguinte programa de amplificação, no termociclador Biometra T Gradient:

- Desnaturação durante 2 minutos a 94 °C;
- 30 Ciclos:
 - Desnaturação a 94 °C durante 30 segundos;
 - Hibridação a 53 °C durante 30 segundos;
 - Extensão a 72 °C durante 30 segundos;
- Extensão final durante 5 minutos a 72 °C.

Ainda na sala de reagentes, imediatamente após pipetar a *master-mix* para os tubos de PCR da 1ª como da 2ª amplificação, colocou-se uma gota de óleo para prevenir possíveis contaminações.

Todas as amostras foram testadas em duplicado e em cada sessão de *nested*-PCR foram incluídos: um CN e CP, preparados de igual modo como explicado no ponto “2.7.1. PCR-RT”. Não foi inserido o controlo interno para cada amostra porque já tinha sido testado na técnica de PCR-RT.

Foram considerados os seguintes critérios de validação e interpretação dos resultados da *nested*-PCR:

- Considerou-se resultado negativo sempre que não se verificou amplificação em nenhuma das duas alíquotas da amostra, correspondendo assim à ausência de bandas no gel de eletroforese;
- Resultado considerado positivo quando se verificou amplificação em uma ou nas duas alíquotas da amostra analisadas, observando-se a banda correspondente ao fragmento amplificado (avaliação realizada por comparação com o marcador de pesos moleculares, aplicado na mesma eletroforese dos amplificados e com a banda do CP).

2.7.2.1 Detecção dos produtos de amplificação

Os produtos obtidos na *nested*-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Gibco, Life Technologies).

Inicialmente diluiu-se 50 mL de tampão TBE (10X) (Gibco, Life Technologies) em 950 mL de água destilada.

Num balão *Erlenmeyer* juntou-se 0,525 g de agarose (NZYTetch, Lisboa) e 35 mL de tampão TBE 1X. Dissolveu-se a agarose numa placa de aquecimento, agitando suavemente, até se obter uma solução homogénea e transparente. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 0,5 µL de *GreenSafe Premium* (NZYTech, Lisboa). Colocou-se o gel de agarose dentro dos suportes na tina de eletroforese (Biometra Horizon 58, Alfagene) e o respetivo pente (8 ou 14 poços, dependendo do número de amostras a visualizar), deixou-se o gel polimerizar durante aproximadamente 10 minutos. Após a polimerização, retirou-se os suportes laterais e o pente, adicionou-se o tampão de eletroforese (tampão TBE 1X) até o gel ficar submerso. Aplicou-se 5 µL de cada amplificado aos quais foi adicionados 2 µL de *Blue de Dye* em seguida aplicou-se 5 µL dessa mistura no poço correspondente. Por fim, os produtos aplicados no gel foram submetidos a um campo elétrico de 140 V, 140 mA, 10 W durante 20 minutos, do *Electrophoresis Power Supply EPS 601* (Amersham Pharmacia Biotch). Em cada gel de agarose no primeiro poço foi aplicado um MPM de 100 pb (Invitrogen).

Para a visualização dos produtos de amplificação, o gel foi colocado no transiluminador sobre luz UV (STX 26M, Unitec). Foi tirada uma fotografia ao gel através do sistema de fotografia digital *Kodak* (Kodak EDAS DC290, Alfagene) para posterior interpretação e discussão dos resultados.

2.8 Limite de deteção das técnicas em estudo

Era expectável obter resultados com baixas cargas virais em salivas de CR, pelo que houve necessidade de determinar o limite de deteção das técnicas em contexto real. Para isso, preparou-se uma amostra de saliva positiva com concentração conhecida, através de uma matriz de amostras de saliva negativas com a adição de concentração conhecida de AD169 e efetuaram-se diluições seriadas de 10 (Figura 2.3). Estas diluições foram testadas em duplicado durante três dias consecutivos, em ambas as técnicas em estudo.

Foi determinado como limite de deteção de cada uma das técnicas a concentração correspondente à última diluição que deu positivo nas três réplicas.

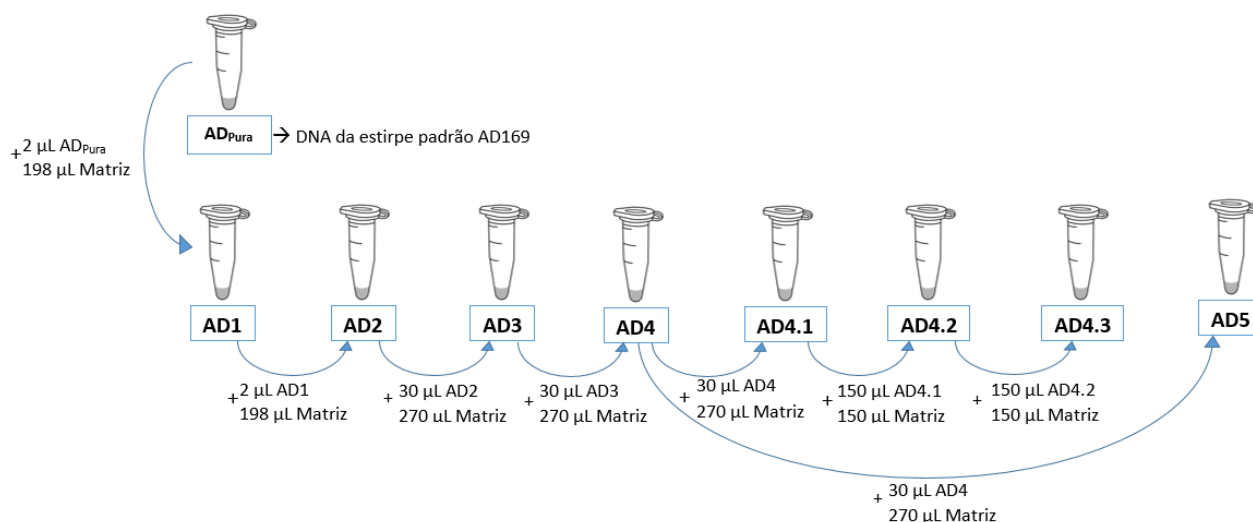


Figura 2.3 – Esquema das diluições efetuadas para determinar o limite de detecção em ambas as técnicas.

2.9 Preparação das *pools* de saliva

Após a análise individual das amostras de saliva, foram preparadas as *pools* de 10 amostras de saliva (*pool*/10) e as de 20 amostras de saliva (*pool*/20) a fim de avaliar se a presença de uma amostra positiva é detetada em cada uma das *pools* testadas (*pool*/10 e *pool*/20). Para manter a matriz de saliva as *pools* foram preparadas utilizando salivas negativas (testadas previamente) e salivas positivas, com diferentes cargas virais (testadas anteriormente). Assim:

Num tubo *ependorf* estéril misturou-se 20 µL de 9 amostras de saliva negativas e 20 µL de 1 amostra de saliva positiva, perfazendo um volume total de 200 µL, no caso das *pool*/10. Para a preparação das *pool*/20, foram pipetados 10 µL de 19 amostras de saliva negativas e 10 µL de 1 amostra de saliva positiva para um tubo *ependorf* estéril.

Após a homogeneização, estas amostras foram submetidas ao processo de extração do DNA e amplificação de acordo com os pontos “2.6 Extração de DNA” e “2.7 Técnicas de Biologia Molecular”.

2.10 Análise Estatística

De modo a validar a metodologia das *pools* de 10 e de 20 amostras de saliva no diagnóstico de infecção congénita por HCMV em amostras de saliva de RN recorreu-se ao coeficiente de correlação de Pearson (r), utilizando o *software* informático estatístico XLSTAT (*Statistics & Data Analysis*) e ao *Microsoft Office Excel*.

Para a avaliação do melhor método de diagnóstico na infecção congénita por HCMV compararam-se os resultados obtidos na PCR-RT com os da *nested*-PCR. A concordância entre eles foi determinada através do cálculo do valor *kappa* (k), com um intervalo de confiança de 95%. Os valores foram interpretados segundo a classificação de *Landis e Koch* (Landis and Koch, 1977), conforme apresentado na tabela 2.6. Recorreu-se

ainda ao teste de *McNemar*, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Para tal, foi utilizado o *software* epidemiológico *EpiTools - Epidemiological Calculators* (Sergeant, 2018), disponível *online*.

Tabela 2. 6 - Interpretação dos valores de k (Landis and Koch, 1977).

Valor de <i>kappa</i> (k)	Concordância
<0	Pobre
0.00-0.20	Fraca
0.21-0.40	Considerável
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Substancial
0.81-1.00	Quase perfeita

3 Resultados e Discussão

3.1 População

O diagnóstico de infeção congénita por HCMV deve ser realizado em RN durante as três primeiras semanas de vida, dado que após esse período se poder tratar de uma infeção pós-natal. No presente estudo, as amostras de saliva foram colhidas durante as duas primeiras semanas de vida, assim caso surgisse um resultado positivo na saliva fosse possível colher uma amostra de urina, para confirmar a infeção congénita pelo vírus Citomegálico.

Dado que em Portugal a prevalência de infeção congénita por HCMV é de 1,05% (Paixão et al., 2009) era esperado a deteção de um pequeno número de salivas positivas entre as amostras de RN pelo que se decidiu aumentar a amostragem com a recolha de salivas de CR. As CR excretam grandes quantidades de vírus na urina e saliva durante períodos prolongados e como frequentam infantários, a taxa de transmissão viral é elevada, por um lado porque existe grande proximidade entre elas e por outro porque compartilham brinquedos que muitas vezes estiveram em contato com a sua saliva. Por estas razões, neste grupo de crianças a persistência de infeções por HCMV é maior, estando descrito que 80% das crianças que frequentem infantários podem excretar HCMV (Adler, 1985; Dobbins et al., 1994; Noyola et al., 2005; Joseph et al., 2006). Com a decisão de incluir CR da faixa etária de 1 a 3 anos pretendia-se obter um maior número de amostras positivas para HCMV.

Durante os 6 meses em que ocorreu o estudo foram colhidas 226 amostras de saliva, das quais 139 foram de RN e 87 de CR colhidas na Unidade de Neonatologia e na Urgência - Serviço de Pediatria do Hospital São Francisco Xavier, CHLO, respetivamente, figura 3.1.

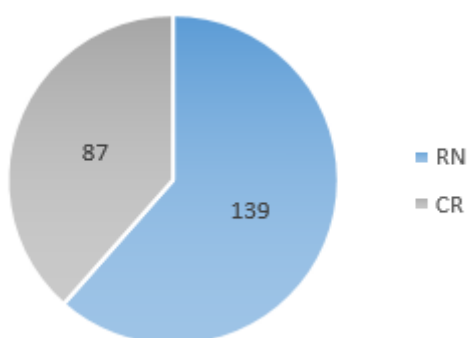


Figura 3.1 - Distribuição da população inserida no estudo.

3.2 Determinação do limite de deteção das técnicas utilizadas no estudo

Antes de começar a analisar as amostras de saliva individuais e em *pools*, foi necessário testar o limite de deteção das duas técnicas utilizadas a PCR-RT e a *nested*-PCR. Para a determinação do limite de deteção foi

utilizada uma suspensão do sobrenadante de uma cultura da estirpe laboratorial AD169 (doravante designada de AD169), partindo-se de uma concentração inicial de $4,4 \times 10^8$ UI/mL. A determinação do limite de detecção foi realizada em dias consecutivos para detetar eventual variabilidade inter-analítica.

3.2.1 Limite de detecção da técnica PCR-RT

Foram testadas diluições de AD169 em matrizes de saliva com as concentrações esperadas de: $4,4 \times 10^6$, $4,4 \times 10^4$, $4,4 \times 10^3$, $4,4 \times 10^2$, $2,2 \times 10^2$, $1,1 \times 10^2$ e $5,5 \times 10^1$ UI/mL, respetivamente, AD1, AD2, AD3, AD4, AD4.1, AD4.2 e AD4.3. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Resultados das diluições para determinar o limite de detecção da técnica PCR-RT.

	Concentração Detetada (UI/mL)		Média (UI/mL)
AD1 [$4,4 \times 10^6$ UI/mL]	$2,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	$1,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	
	$2,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	
AD2 [$4,4 \times 10^4$ UI/mL]	$1,9 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
	$2,1 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	
	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	
AD3 [$4,4 \times 10^3$ UI/mL]	$3,9 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
	$6,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	
	$1,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	
AD4 [$4,4 \times 10^2$ UI/mL]	$9,4 \times 10^2$	$7,7 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	
	$7,3 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$	
AD4.1 [$2,2 \times 10^2$ UI/mL]	$1,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
	$1,6 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	
	$1,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	
AD4.2 [$1,1 \times 10^2$ UI/mL]	Negativo	Negativo	a)
	$7,0 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$	
	Negativo	Negativo	
AD4.3 [$5,5 \times 10^1$ UI/mL]	Negativo	Negativo	-
	Negativo	Negativo	
	Negativo	Negativo	

a) Resultado indeterminado (1 resultado positivo entre as 3 réplicas realizadas).

Com estes resultados o limite de detecção da PCR-RT foi de 150 UI/mL, a última diluição com resultados positivos consistentes, nas três réplicas, em ambos os duplicados.

3.2.2 Limite de detecção da técnica *nested*-PCR

Na técnica *nested*-PCR foram testadas as concentrações $4,4 \times 10^6$, $4,4 \times 10^4$, $4,4 \times 10^3$, $4,4 \times 10^2$ e $4,4 \times 10^1$ UI/mL, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Resultados das diluições para determinar o limite de detecção da técnica *nested*-PCR.

	Observação do gel de electroforese ao transiluminador		Resultado Final
AD1 [4,4x10 ⁶ UI/mL]	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	Positivo
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
AD2 [4,4x10 ⁴ UI/mL]	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	Positivo
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
AD3 [4,4x10 ³ UI/mL]	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	Positivo
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
AD4 [4,4x10 ² UI/mL]	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	Positivo
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
	Presença de banda 100 pb	Presença de banda 100 pb	
AD5 [4,4x10 ¹ UI/mL]	Ausência de banda	Ausência de banda	a)
	Presença de banda 100 pb	Ausência de banda	
	Ausência de banda	Presença de banda 100 pb	

a) Valor indeterminado (2 resultados positivos em 6 réplicas).

Os resultados obtidos permitem afirmar que o limite de detecção da técnica é 440 UI/mL (concentração correspondente á amostras AD4), dado que esta é a última diluição detetada consistentemente na *nested*-PCR.

3.3 Análise das amostras de *spiking* por PCR-RT

Como esperado as 4 amostras SPK apresentaram um resultado positivo, os valores da sua quantificação estão apresentados na tabela 3.3. Quanto aos resultados das *pools* de 10 verificamos que a PCR detetou DNA do HCMV nas *pool*10 das amostras SPK 1 a SPK3, ou seja, as que tinham concentrações iniciais de AD169 de 2,1x10⁶ a 1,5x10³ UI/mL. Na *pool*10 SPK 4, preparada com a suspensão com menor concentração inicial de AD169 (1,1x10² UI/mL), não foi detetado nenhum DNA na PCR-RT (tabela 3.3).

Como o limite de detecção da técnica de PCR-RT foi de 150 UI/mL e a carga viral esperada para a *pool*10 SPK4 era de 110 UI/mL, ou seja, uma concentração abaixo do limite de detecção da técnica, pelo que o resultado obtido era espectável.

A seleção das concentrações para realizar os ensaios de *spiking* teve por base os valores de carga viral usuais nas salivas dos RN infectados congenitamente. Num estudo recentemente realizado no nosso laboratório com amostras colhidas em RN com infeção congénita confirmada, os valores de carga viral variaram entre 7,4x10³ e 8,2x10⁷ UI/mL (Fernandes et al., 2020). Num estudo anterior, a nossa equipa identificou cargas na urina,

analisados com a mesma técnica de PCR, entre $6,4 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^7$ cópias/mL (fator de conversão para UI/mL = 1,11, ou seja, $7,0 \times 10^3$ e $4,5 \times 10^7$ UI/mL) (Paixão et al., 2012).

Este ensaio de *spiking* demonstrou que com a metodologia das *pool*10 é possível detetar as amostras com carga viral até $4,0 \times 10^2$ UI/mL.

Tabela 3.3 - Resultados das 4 amostras SPK e respectivas *pool*10 na técnica PCR-RT.

	Saliva	<i>Pool</i> 10
	UI/mL*	UI/mL*
SPK1	$2,10 \times 10^6$	$2,90 \times 10^5$
SPK2	$1,80 \times 10^4$	$5,40 \times 10^3$
SPK3	$1,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^2$
SPK4	$1,10 \times 10^2$	Negativo

*valores médios dos duplicados

3.4 Análise das amostras *spiking* pela técnica *nested*-PCR

Os resultados obtidos nas amostras SPK com a técnica *nested*-PCR são os apresentados na tabela 3.4. As 4 amostras SPK apresentaram um resultados positivo, como seria de esperar. Nas *pools* de 10 das amostras SPK1 a SPK3 houve deteção de DNA do HCMV, a quantificação destas amostras pela PCR-RT mostrou que variaram entre $2,90 \times 10^5$ e $4,0 \times 10^2$ UI/mL.

Na *pool*10 da amostra SPK4 não houve deteção de DNA do HCMV, dado que o valor da concentração se situa abaixo do limite de deteção (concentração estimada para esta *pool*10 será $1,1 \times 10^1$ UI/mL, valor abaixo do limite de deteção da *nested*-PCR que foi de $4,4 \times 10^2$ UI/mL).

Tabela 3.4 - Resultados qualitativos das 4 amostras SPK e das respectivas *pool*10 na técnica *nested*-PCR.

	Saliva	<i>Pool</i> 10
SPK1	Positivo	Positivo
SPK2	Positivo	Positivo
SPK3	Positivo	Positivo
SPK4	Positivo	Negativo

3.5 Análise qualitativa das amostras de saliva por PCR-RT

A PCR-RT foi a técnica escolhida para a análise individual das salivas porque se trata de uma técnica com elevada sensibilidade, mais rápida, menos laboriosa, reprodutível e menor risco de contaminação, quando comparada à *nested*-PCR. Outra das vantagens da PCR-RT é permitir a quantificação do DNA do HCMV (no ponto “1.8.5. Técnicas de PCR”).

Foram testadas as 226 amostras de saliva individualmente (Anexo IV e V). Destas obteve-se 13 amostras de salivas positivas, uma de RN e 12 de CR, as restantes 213 amostras de saliva foram negativas. Duas amostras de saliva positivas para HCMV de CR foram excluídas do estudo (TD61 e TD66), porque o seu volume era insuficiente para os restantes testes.

Dado que se obteve um número muito pequeno de amostras de saliva positivas para HCMV em RN, foram incluídas no presente estudo 11 amostras de saliva de RN anteriormente diagnosticadas com infeção congénita pelo vírus Citomegálico e que se encontravam armazenadas no laboratório. Estas amostras foram denominadas com as iniciais “CMV” e com a numeração corresponde ao número atribuído pelo laboratório (Anexo VI).

No total o nosso estudo prosseguiu com 22 amostras de saliva positivas para HCMV, em que 12 (54,5%) eram de RN e 10 (45,5%) de CR num total de 235 amostras de saliva, como representado na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Resultados obtidos através da técnica PCR-RT na análise individual das amostras de saliva.

	PCR-RT Positiva	PCR-RT Negativa	Total
RN	12	138	150
CR	10	75	85
Total	22	213	235

3.5.1 Análise qualitativa das amostras de urina por PCR-RT

Quando foi obtido um resultado positivo para HCMV numa amostra de saliva de RN foi solicitada a colheita de urina que foi testada para confirmar a infeção congénita por HCMV.

No total deveriam ter sido analisadas 12 amostras de urina correspondentes às amostras de saliva identificadas como positivas. No entanto, apenas 5 amostras de urina foram testadas na técnica PCR-RT durante o nosso estudo, os resultados estão apresentados na tabela 3.6. As restantes foram análises noutros laboratório e só disponibilizada a informação que eram positivas.

Tabela 3.6 – Resultados qualitativos das amostras de urina utilizando a técnica PCR-RT.

Amostra	Resultado (Média CTs)
TD149	Positivo (30,9)
CMV57A	Positivo (25,1)
CMV82	Positivo (22,4)
CMV305A	Positivo (25,2)
CMV422A	Positivo (24,7)
CMV481A	Negativo

3.5.2 Análise qualitativa das *pool/10* e *pool/20*

Inicialmente prepararam-se 22 *pool/10*, das quais 20 foram positivas, uma com resultado indeterminado e uma foi negativa. Nas *pool/10* a amostra de saliva sofreu uma diluição de 1:10, pelo que era esperado que o valor de CT aumentasse cerca de 2 ou 3 CTs, respetivamente ao valor obtido na avaliação da amostra individual. Verificou-se que o valor de CT da amostra aumentou 2 a 3 CTs em 35% das amostras.

O estudo prosseguiu com a análise de *pool/20*, nestas as salivas foram diluídas em 19 salivas negativas, realizando-se uma diluição 1:20. Os resultados obtidos mostraram que 18 *pool/20* foram positivas, 3 foram negativas e numa o resultado foi indeterminado porque num dos duplicados o resultado foi positivo e noutro negativo, que implicou a análise das 20 amostras individuais. Os resultados estão apresentados na tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Resultados qualitativos obtidos na técnica PCR-RT das amostras de saliva individuais, *pool/10* e *pool/20*.

	Saliva	<i>Pool/10</i>	<i>Pool/20</i>
PCR-RT Positiva	22	20	18
PCR-RT Negativa	213	1	3
PCR-RT indeterminada	0	1	1
Total	235	22	22

3.6 Quantificação da carga viral das amostras positivas por PCR-RT

Depois da análise qualitativa de todas as amostras (salivas, *pool/10*, *pool/20*) procedeu-se à quantificação absoluta das cargas virais das amostras com resultado positivo para HCMV através da técnica PCR-RT.

Em cada série de PCR quantitativa foi realizada uma curva padrão, como descrito no ponto “2.7.1.1 Quantificação”. Para a realização da curva padrão recorreu-se ao NIBSC, o primeiro padrão internacional para o HCMV, o que tem como vantagem permitir a comparação interlaboratorial dos resultados permitindo que a monitorização das cargas virais dos pacientes, possa ser seguido em qualquer laboratório que utilize a mesma curva padrão dado que desta forma os resultados têm a mesma referência.

A curva padrão é representada por uma regressão linear de equação $y = mx + b$. O declive da reta (m) permite determinar a eficiência de amplificação, fundamental para o sucesso da técnica. Idealmente, as amplificações devem ter uma eficiência próxima de 100%, para que os resultados sejam precisos e reprodutíveis, isto equivale a um declive de -3,32. Uma técnica que apresente valores de eficiência entre 90 a 110%, o que corresponde a um declive entre -3,58 e -3,10, significa que tem um bom desempenho (Handbook).

O declive das curvas padrão utilizadas na quantificação do HCMV nas amostras positivas variou entre -3,53 e -3,02. Através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$ calculou-se a eficiência das reações, que variou entre 92% e 114%.

Com estes resultados é possível afirmar que obtivemos uma boa eficiência de amplificação nas quantificações realizadas.

O coeficiente de correlação (R^2) reflete a linearidade da reação. Idealmente, R^2 deve ser igual a 1, embora 0,999 seja o valor máximo (Handbook). No presente estudo os coeficientes de correlação variaram entre 0,996 e 0,999.

As quantificações das amostras foram obtidas por extrapolação dos CTs nas curvas padrão realizadas. Todos os resultados foram expressos em UI/mL.

3.6.1 Quantificação da carga viral das salivas e *pools* positivas por PCR-RT

Como se pode observar na tabela 3.8, as concentrações de DNA de HCMV presente nas 22 amostras de saliva positivas testadas, variaram entre $8,8 \times 10^7$ a $4,72 \times 10^1$ UI/mL. As concentrações de DNA de HCVM nas amostras de saliva dos RN variaram entre $1,7 \times 10^3$ e $8,2 \times 10^7$ UI/mL, enquanto as concentrações das amostras de CR foram mais baixas, variaram entre $4,7 \times 10^1$ e $5,2 \times 10^5$ UI/mL. As concentrações das *pool*/10 variaram entre $2,84 \times 10^6$ a $3,83 \times 10^1$ UI/mL. Por fim, as das *pool*/20 entre $1,22 \times 10^7$ a $2,74 \times 10^1$ UI/mL. Como era de esperar a concentração de DNA de HCMV presente nas amostras de saliva testadas individualmente foi maioritariamente 10 (10^1) vezes superior à da respetiva *pool*/10. Exceto nas amostras de saliva TD149 e CMV307A em que foram 100 (10^2) vezes superior à da respetiva *pool*/10. Nas *pool*/10 TD60, CMV253 e CMV422 as cargas virais mantiveram-se constantes em relação às respetivas amostras de saliva.

Em relação às *pool*/20, as amostras de saliva individuais foram maioritariamente 10 (10^1) vezes superiores às cargas virais presentes nas *pool*/20. As *pool*/20 CMV307A, TD217, TD149 e TD129 obtiveram concentrações 100 vezes (10^2) mais elevadas que as amostras de saliva testadas individualmente. As restantes 4 *pool*/20 positivas para HCMV (CMV57A, CMV253, CMV566A e CMV422) tinham concentrações semelhantes às das amostras de saliva.

De modo a averiguar qual a melhor metodologia (*pool*/10 ou *pool*/20) procedeu-se à comparação entre os resultados quantitativos obtidos nas duas metodologias de *pools* e os obtidos com as amostras de saliva testadas de forma individual, recorrendo ao coeficiente de correlação de Pearson (r). Neste tipo de avaliação os valores de $p \leq 0,1$ são considerados estatisticamente significativos. Os resultados do nosso estudo mostraram que as duas abordagens apresentavam correlações positivas e estatisticamente significativas (*pool*/10: $r = 0,922$, $p < 0,01$; *pool*/20: $r = 0,999$, $p < 0,01$). Este resultados permite afirmar que tanto a metodologia *pool*/10 como a de *pool*/20 são válidos para a realização do diagnóstico de infeção congénita por HCMV utilizando amostras de saliva de RN, ou seja, é possível detetar uma amostra de saliva positiva para HCMV mesmo que esta esteja diluída em 9 ou 19 amostras de saliva negativas (Silva et al., 2020).

Tabela 3.8 – Resultados obtidos nas técnicas PCR-RT quantitativa e *nested*-PCR de todas as amostras de saliva e respectivas *pool*10 e *pool*20.

Saliva					Pool10				Pool20			
Amostra	UI/mL	Média	Nested-PCR		UI/mL	Média	Nested-PCR		UI/mL	Média	Nested-PCR	
CMV57A	8,73E+07	8,18E+07	Pos.	Pos.	2,72E+06	2,84E+06	Pos.	Pos.	1,44E+07	1,22E+07	Pos.	Pos.
	7,63E+07		Pos.		2,95E+06		Pos.		9,95E+06		Pos.	
CMV82	1,51E+07	1,50E+07	Pos.	Pos.	1,75E+06	1,78E+06	Pos.	Pos.	2,32E+06	2,32E+06	Pos.	Pos.
	1,49E+07		Pos.		1,81E+06		Pos.		2,32E+06		Pos.	
CMV307A	1,91E+06	2,03E+06	Pos.	Pos.	4,70E+04	4,49E+04	Pos.	Pos.	8,35E+04	8,13E+04	Pos.	Pos.
	2,14E+06		Pos.		4,28E+04		Pos.		7,92E+04		Pos.	
CMV253	8,35E+05	8,36E+05	Pos.	Pos.	6,10E+05	6,00E+05	Pos.	Pos.	1,72E+05	1,67E+05	Pos.	Pos.
	8,36E+05		Pos.		5,89E+05		Pos.		1,62E+05		Pos.	
CMV566A	7,45E+05	6,86E+05	Pos.	Pos.	4,57E+04	4,39E+04	Pos.	Pos.	5,60E+05	5,28E+05	Pos.	Pos.
	6,27E+05		Pos.		4,21E+04		Pos.		4,96E+05		Pos.	
TD118	5,78E+05	5,21E+05	Pos.	Pos.	8,80E+04	9,87E+04	Pos.	Pos.	2,96E+04	3,39E+04	Pos.	Pos.
	4,64E+05		Pos.		1,09E+05		Pos.		3,82E+04		Pos.	
CMV422	8,03E+04	8,75E+04	Pos.	Pos.	4,01E+04	3,94E+04	Pos.	Pos.	1,23E+04	1,25E+04	Pos.	Pos.
	9,47E+04		Pos.		3,87E+04		Pos.		1,27E+04		Pos.	
CMV305A	5,69E+04	6,06E+04	Pos.	Pos.	2,44E+03	2,49E+03	Pos.	Pos.	7,63E+03	7,78E+03	Pos.	Pos.
	6,42E+04		Pos.		2,54E+03		Pos.		7,92E+03		Pos.	
CMV103A	3,90E+04	4,22E+04	Pos.	Pos.	4,83E+03	5,22E+03	Pos.	Pos.	1,00E+00	1,29E+03	Pos.	Pos.
	4,54E+04		Pos.		5,60E+03		Pos.		2,58E+03		Pos.	
CMV663	3,10E+04	3,07E+04	Pos.	Pos.	1,03E+04	6,85E+03	Pos.	Pos.	2,45E+03	2,62E+03	Pos.	Pos.
	3,04E+04		Pos.		3,43E+03		Pos.		2,79E+03		Pos.	
TD65	2,55E+04	2,95E+04	Pos.	Pos.	5,86E+03	4,80E+03	Pos.	Pos.	1,27E+03	1,32E+03	Pos.	Pos.
	3,34E+04		Pos.		3,73E+03		Pos.		1,38E+03		Pos.	
TD217	2,49E+04	2,43E+04	Pos.	Pos.	2,16E+03	2,14E+03	Pos.	Pos.	6,82E+02	4,41E+02	Pos.	Pos.
	2,38E+04		Pos.		2,12E+03		Pos.		2,00E+02		Pos.	
CMV12A	7,25E+03	7,38E+03	Pos.	Pos.	5,81E+02	5,40E+02	Pos.	Pos.	4,36E+02	4,36E+02	Pos.	Pos.
	7,52E+03		Pos.		4,98E+02		Pos.		4,36E+02		Pos.	
CMV481	4,91E+03	6,90E+03	Pos.	Pos.	8,80E+02	7,65E+02	Pos.	Pos.	4,68E+02	4,70E+02	Pos.	Pos.
	8,90E+03		Pos.		6,50E+02		Pos.		4,72E+02		Pos.	
TD63	4,94E+03	5,12E+03	Pos.	Pos.	2,05E+02	2,70E+02	Pos.	Pos.	1,57E+02	1,33E+02	Pos.	Pos.
	5,31E+03		Pos.		3,35E+02		Pos.		1,08E+02		Neg.	
TD149	1,78E+03	1,69E+03	Pos.	Pos.	8,86E+01	8,19E+01	Pos.	Pos.	6,30E+01	8,61E+01	Pos.	Pos.
	1,59E+03		Pos.		7,53E+01		Pos.		1,09E+02		Neg.	

Tabela 3.8 – Resultados obtidos nas técnicas PCR-RT quantitativa e *nested*-PCR de todas as amostras de saliva e respectivas *pool*10 e *pool*20.

Saliva					Pool10					Pool20				
Amostra	UI/mL	Média	Nested-PCR		UI/mL	Média	Nested-PCR		UI/mL	Média	Nested-PCR			
TD129	1,36E+03	1,36E+03	Pos.	Pos.	2,97E+02	2,30E+02	Pos.	Pos.	1,87E+01	2,74E+01	Pos.	Pos.		
	1,36E+03		Pos.		1,62E+02		Pos.		3,62E+01		Neg.			
TD47	9,14E+02	8,05E+02	Pos.	Pos.	1,73E+01	3,83E+01	Pos.	Pos.	Negativo		Neg.	Neg.		
	6,96E+02		Pos.		5,93E+01		Pos.				Neg.			
TD57	2,85E+02	2,42E+02	Pos.	Pos.	-	a)	Pos.	Pos.	4,76E+02	3,50E+02	Pos.	Pos.		
	1,99E+02		Pos.		7,58E+01		Pos.		2,23E+02		Pos.			
TD221	2,80E+02	2,13E+02	Neg.	Neg.	6,21E+01	9,63E+01	Pos.	Pos.	-	a)	Neg.	Neg.		
	1,45E+02		Neg.		1,31E+02		Neg.		2,17E+02		Neg.			
TD60	6,21E+01	1,13E+02	Pos.	Pos.	4,01E+01	1,05E+02	Neg.	Pos.	Negativo		Neg.	Neg.		
	1,64E+02		Pos.		1,69E+02		Pos.				Neg.			
TD39	6,04E+01	4,72E+01	Pos.	Pos.	Negativo		Neg.	Neg.	Negativo		Neg.	Neg.		
	3,41E+01		Neg.				Neg.				Neg.			

Pos. - Presença de banda 100pb; Neg.- Ausência de banda; a) Duplicado com valores discordantes, valor final indeterminado. Nestas *pools* seria necessário analisar as amostras individualmente.

3.6.2 Quantificação da carga viral das amostras de urina positivas por PCR-RT

Procedeu-se à quantificação da carga viral das amostras de urina positivas para HCMV. Foram quantificadas as 5 amostras de urina testadas anteriormente por PCR-RT. Na tabela 3.9 é possível verificar que a carga viral das amostras de saliva CMV57A e CMV82 foi, respetivamente, superior 100 (10^2) e 10 (10^1) vezes à da amostra de urina. O contrário aconteceu nas amostras de saliva CMV422A, CMV305A, em que a carga viral detetada foi superior nas amostras de urina, 100 (10^2) e 10 (10^1) vezes, respetivamente. As cargas virais da amostra TD149 foram constantes.

Um estudo recente realizado em recém-nascidos em que as progenitoras tinham infeção primária por HCMV confirmada, comparou a carga viral entre amostras de urina e saliva e concluíram que a carga viral presente na urina é significativamente maior do que existente na saliva (Exler et al., 2019).

No nosso estudo analisou-se um número pequeno de amostras de urina, apenas 5, pelo não é possível retirar conclusões muito robustas, para tal seria necessário quantificar mais amostras, tanto de saliva como de urina.

Tabela 3.9 - Comparação das cargas virais obtidas nas amostras de saliva e urina positivas para HCMV por PCR-RT.

Amostra	Saliva	Urina
	UI/mL*	
CMV57A	$8,18 \times 10^7$	$9,25 \times 10^5$
CMV82	$1,50 \times 10^7$	$5,25 \times 10^6$
CMV422A	$8,75 \times 10^4$	$7,21 \times 10^5$
CMV305A	$6,06 \times 10^4$	$1,18 \times 10^6$
TD149	$1,69 \times 10^3$	$8,77 \times 10^3$

*valores médios dos duplicados

3.7 Análise das amostras de saliva e pools positivas pela técnica *nested*-PCR

As amostras de saliva testadas individualmente, as *pool*/10 e as *pool*/20 com resultado positivo para HCMV na PCR-RT foram testadas pela técnica *nested*-PCR. Através da análise da tabela 3.8, onde estão apresentados os resultados obtidos pela técnica *nested*-PCR, num total de 66 amostras testadas, 60 foram positivas para HCMV, das quais 21 amostras de saliva, 21 *pool*/10 e 18 *pool*/20 e apenas 6 foram negativas, 1 amostra de saliva, 1 *pool*/10 e 4 *pool*/20.

Um total de 66 amostras foram testadas em ambos os métodos de diagnóstico para determinar o melhor método para o diagnóstico de infeção congénita por HCMV em amostras de saliva de RN (Tabela 3.10). Os resultados da PCR-RT foram positivos em 60 das 66 amostras (90,9%), 4 amostras foram negativas (6,1%), as restantes obtiveram um resultado indeterminado. Secenta das 66 amostras testadas foram postivas técnica de *nested*-PCR (90,9%),e 6 amostras foram negativas (9,1%). Quatro amostras foram negativas em ambas as

técnicas. Os resultados obtidos na PCR-RT e na *nested*-PCR foram concordantes em 64 amostras (98,4%) ($p = 0,500$). Os resultados foram discordantes em 2 amostras (TD221 e *pool*/10 TD57). A amostra TD221 foi positiva na técnica de PCR-RT e negativa na *nested*-PCR. A outra amostra obteve um resultado indeterminado na técnica de PCR-RT, foi considerada negativa e foi positiva na *nested*-PCR. Como p -value foi superior ao nível de significância (α), é possível concluir que os métodos de diagnóstico não são estatisticamente diferentes, isto é, são semelhantes.

O valor de k foi de 0,8167, ou seja, é possível afirmar que entre os dois métodos de diagnóstico estudados existe uma boa concordância e uma vez que a diferença encontrada entre estes foi estatisticamente semelhante, sugere que ambos os métodos são capazes de detetar o HCMV, neste caso o método a utilizar não influencia o diagnóstico de infeção congénita por HCMV em amostras de saliva.

Tabela 3.10 - Comparação dos resultados obtidos pela técnica *nested*-PCR e PCR-RT utilizadas no estudo.

		PCR-RT		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Nested</i> -PCR	Positivo	59	1	60
	Negativo	1	5	6
Total		60	6	66

3.8 Redução de custos associados à metodologia de *pools*

A validação da metodologia de *pools* de 10 e 20 amostras de saliva no diagnóstico de infeção congénita por HCMV permite uma redução de aproximadamente 85% e 89%, respetivamente, quando comparada à análise de cada amostra de saliva individualmente.

Esta redução significativa de custos permitiria a implementação de um programa de rastreio universal e assim diagnosticar todos os RN com infeção congénita por HCMV.

4 Conclusões

Este estudo teve como principal objetivo fundamentar a possibilidade de recorrer à metodologia de *pools* para a deteção e diagnóstico de infeção congénita pelo vírus Citomegálico em amostras de saliva de RN.

Inicialmente a metodologia das *pools* de 10 amostras foi testada através de quatro amostras SPK, nas duas técnicas de biologia molecular em estudo e permitiu verificar que esta metodologia é uma potencial alternativa à análise individual de amostras de saliva.

Foram estudadas 226 amostras de saliva individuais e, recorrendo à metodologia de *pools* de 10 e 20 amostras de saliva, metodologia anteriormente desenvolvida por Paixão *et al.* (Paixão *et al.*, 2005, 2012) em amostras de urina, demonstrou-se que ambas as metodologias de *pools* apresentaram sensibilidade e especificidade semelhantes no diagnóstico da infeção, quando comparadas com a análise individual, e foi possível detetar até à concentração de 47,2 UI/mL. Como este valor é inferior ao limite de deteção da técnica, os resultados podem não ser consistentes. Esta metodologia permite uma redução de custos de aproximadamente 85% e 89%, respetivamente, para as *pool*10 e *pool*20 quando comparada à análise individual. Assim, conclui-se que com recurso à metodologia de *pools* descrita, é possível reduzir os custos do diagnóstico sem afetar a sensibilidade para a deteção de infeções congénitas por HCMV. Sendo uma metodologia prática e economicamente viável, pode abrir a possibilidade de se implementar o rastreio neonatal para o HCMV em larga escala.

O uso de amostras de saliva, na deteção de HCMV por PCR-RT, mostrou ter sensibilidade semelhante a amostras de urina, o que se encontra de acordo com estudos anteriormente realizados (Yamamoto *et al.*, 2006; Boppana *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2014). Esta amostra biológica é promissora no diagnóstico de infeção congénita por HCMV, visto que é uma alternativa à utilização dos sacos coletores de urina pediátricos, tornando-se numa colheita mais fácil e num procedimento menos desconfortável tanto para o RN, como para os progenitores. No entanto, devido à possibilidade da existência de resultados falso-positivos ao recorrer a amostras de saliva, a colheita desta, deve ser realizada imediatamente antes ou pelo menos uma hora depois da amamentação. Todos os resultados positivos para HCMV em amostras de saliva, devem ser confirmados por uma amostra de urina colhida até à terceira semana de vida.

Relativamente às técnicas de diagnóstico utilizadas no estudo, é possível afirmar que a PCR-RT parece ser o método de diagnóstico mais indicado para o diagnóstico da infeção porque embora não tenha havido resultados discrepantes nas duas técnicas a PCR-RT é o método que se enquadra melhor no contexto desta dissertação, pois apresenta maior sensibilidade e especificidade. A PCR-RT apresenta ainda outras vantagens, como referido anteriormente, como permitir a quantificação do DNA e a automatização da reação, não ser necessária a realização de duas amplificações, nem do gel de eletroforese para visualização dos resultados, o que torna a técnica menos trabalhosa e com menor risco de contaminação. Apenas necessita de um

equipamento para deteção e quantificação do DNA, e que com o uso do padrão internacional torna possível a monitorização dos resultados, o que é importante no acompanhamento das crianças.

O HCMV, é um importante problema de saúde pública e a implementação de um programa de rastreio universal tem vindo a ser discutida há vários anos, pois permitiria a deteção precoce de crianças infetadas congenitamente, principalmente os RN que nascem assintomáticos e, conseqüentemente, o reconhecimento e intervenção precoce de sequelas que possam surgir, de certo modo permitiria uma melhor qualidade de vida nestes casos.

Em conclusão, o diagnóstico de infeção congénita por HCMV através da metodologia de *pools* de amostras de saliva de RN mostrou-se um método viável e com uma redução de custos significativa, o que tornaria possível a implementação de um rastreio universal e assim diminuir o impacto desta infeção na população de RN e crianças, sendo estes os mais afetados.

Como a presente dissertação apresentou resultados promissores no diagnóstico de infeção congénita por HCMV, antes de adotar esta metodologia na rotina dos RN, deveria ser realizado um estudo em que a amostragem fosse maior e mais representativa. Por exemplo, no ano de 2019, nasceram em Portugal 87 364 crianças (INSA), caso fosse implementado o diagnóstico de infeção congénita pelo vírus Citomegálico em RN, era possível diagnosticar cerca de 583 RN infetados congenitamente.

5 Referências Bibliográficas

- Adler, S. P.** (1991). Cytomegalovirus and child day care: risk factors for maternal infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 10(8), 590-594.
- Adler, S. P., Starr, S. E., Plotkin, S. A., Hempfling, S. H., Buis, J., Manning, M. L., and Best, A. M.** (1995). Immunity Induced by Primary Human Cytomegalovirus Infection Protects against Secondary Infection among Women of Childbearing Age. *Journal of Infectious Diseases*, 171(1), 26-32.
- Adler, S. P., Finney, J. W., Manganello, A. M., and Best, A. M.** (2004). Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *The Journal of Pediatrics*, 145(4), 485-491.
- Adler, S. P., and Marshall, B.** (2007). Cytomegalovirus Infections. *Pediatrics in Review*, 28(3), 92.
- Adler, S. P., Manganello, A. M., Lee, R., McVoy, M. A., Nixon, D. E., Plotkin, S., ... Kemble, G.** (2016). A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus–Seronegative Men. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(9), 1341-1348.
- Adli, A. H., Karami, C., Rahimi, S. B., Mirarab, A., and Tabarraei, A.** (2018). What family doctors know about congenital CMV: a regional survey in Iran. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(1), 31.
- Agrawal, P., and Gillham, J.** (2010). Fetal infection: a pragmatic approach to recognition and management. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 20(1), 22-26.
- Allen, A. A., Baquero-Artigao, F., and Grupo de Estudio de la Infección por Citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica.** (2011). Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. In *Anales de Pediatría* (Vol. 74, No. 1, pp. 52-e1). Elsevier Doyma.
- Almeida, S., Gouveia, P., Jorge, A., Mendes, A., Duarte, C., Faria, N., and Paixão, P.** (2010). Infecção congênita por Citomegalovirus. Prevalência numa população da Beira Interior. *Acta Pediatrica Portuguesa*, 41(4), 162-1655.
- Al-Orifi, F., McGillivray, D., Tange, S., and Kramer, M. S.** (2000). Urine culture from bag specimens in young children: are the risks too high?. *The Journal of Pediatrics*, 137(2), 221-226.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R.** (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Balcarek, K. B., Warren, W., Smith, R. J., Lyon, M. D., & Pass, R. F.** (1993). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *Journal of Infectious Diseases*, 167(6), 1433-1436.

- Baquero-Artigao, F., and Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica.** (2009). Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *Anales de Pediatría*, 71(6), 535-547. Elsevier Doyma.
- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Luraschi, C., and Corbetta, C.** (1996). Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. *Clinical and Diagnostic Virology*, 6(1), 27-32.
- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Caroppo, S., Didò, P., Guidotti, P., ... and Melotti, D.** (2000). Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *Journal of Clinical Virology*, 17(3), 159-165.
- Barbi, M., Binda, S., Caroppo, S., and Primache, V.** (2006). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 206-209.
- Barkai, G., Roth, D. A. E., Barzilai, A., Tepperberg-Oikawa, M., Mendelson, E., Hildesheimer, M., and Kuint, J.** (2014). Universal neonatal cytomegalovirus screening using saliva – Report of clinical experience. *Journal of Clinical Virology*, 60(4), 361-366.
- Baumforth, K. R. N., Nelson, P. N., Digby, J. E., O'Neil, J. D., and Murray, P. G.** (1999). The polymerase chain reaction demystified. *Molecular Pathology*, 52, 1-10.
- Beltran, P. M. J., and Cristea, I. M.** (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 11(6), 697-711.
- Benoist, G., Jacquemard, F., Leruez-Ville, M., and Ville, Y.** (2008a). Cytomegalovirus (CMV) congenital infection. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 36(3), 248-260.
- Benoist, G., Salomon, L. J., Mohlo, M., Suarez, B., Jacquemard, F., and Ville, Y.** (2008b). Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 32(7), 900-905.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G., and Stryer, L.** (2015). Biochemistry, pp. 141-142.
- Bermingham, N., and Luetlich, K.** (2003). Polymerase Chain Reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 9(3), 159-164.

- Bernstein, D. I., Munoz, F. M., Callahan, S. T., Rupp, R., Wootton, S. H., Edwards, K. M., ... and Bellamy, A. R.** (2016). Safety and Efficacy of a Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) Vaccine in Adolescent Girls: A Randomized Clinical Trial. *Vaccine*, 34(3), 313-319.
- Bialas, K. M., Swamy, G. K., and Permar, S. R.** (2015). Perinatal cytomegalovirus and varicella zoster virus infections: epidemiology, prevention, and treatment. *Clinics in perinatology*, 42(1), 61-75.
- Binda, S., Caroppo, S., Didò, P., Primache, V., Veronesi, L., Calvario, A., ... and Barbi, M.** (2004). Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. *Journal of Clinical Virology*, 30(3), 276-279.
- Boeckh, M., Woogerd, P. M., Stevens-Ayers, T., Ray, C. G., and Bowden, R. A.** (1994). Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 832-834.
- Boeckh, M., and Geballe, A. P.** (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1673-1680.
- Bonalumi, S., Trapanese, A., Santamaria, A., D'Emidio, L., and Mobili, L.** (2011). Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *Journal of Prenatal Medicine*, 5(1), 1.
- Boppana, S. B., Smith, R. J., Stagno, S., and Britt, W. J.** (1992). Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 721-723.
- Boppana, S., Fowler, K., & Arvin, A.** (2007). Persistence in the population: epidemiology and transmission Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, 795-813.
- Boppana, S. B., Ross, S. A., Novak, Z., Shimamura, M., Tolan, R. W., Palmer, A. L., ... and Fowler, K. B.** (2010). Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*, 303(14), 1375-1382.
- Boppana, S. B., Ross, S. A., Shimamura, M., Palmer, A. L., Ahmed, A., Michaels, M. G., ... and Fowler, K. B.** (2011). Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *New England Journal of Medicine*, 364(22), 2111-2118.
- Britt, W., and Mach, M.** (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, 39, 401-412.
- Britt, W.** (2011). Cytomegalovirus. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn E-Book: Expert Consult-Online and Print*, 707-745. Elsevier Health Sciences.

- Burkardt, H. J.** (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 38(2), 87-91.
- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., and Dargan, D. J.** (1998). Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Journal of Structural Biology*, 124(1), 70-76.
- Buxmann, H., Stackelberg, O. M., Schlößer, R. L., Enders, G., Gonser, M., Meyer-Wittkopf, M., ... and Enders, M.** (2012). Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *Journal of Perinatal Medicine*, 40, 439-446.
- Cahill, A. G., Odibo, A. O., Stamilio, D. M., and Macones, G. A.** (2009). Screening and treating for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: where do we stand? A decision-analytic and economic analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(5), 466-e1.
- Cannon, M. J., and Davis, K. F.** (2005). Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*, 5(1), 70.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B.** (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202-213.
- Cannon, M. J., Westbrook, K., Levis, D., Schleiss, M. R., Thackeray, R., and Pass, R. F.** (2012). Awareness of and behaviors related to child-to-mother transmission of cytomegalovirus. *Preventive Medicine*, 54(5), 351-357.
- Cannon, M. J., Griffiths, P. D., Aston, V., and Rawlinson, W. D.** (2014). Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit?. *Reviews in Medical Virology*, 24(5), 291-307.
- Cardoso, E. S. D. C., Jesus, B. L. S. D., Gomes, L. G. D. S., Sousa, S. M. B., Gadelha, S. R., and Marin, L. J.** (2015). The use of saliva as a practical and feasible alternative to urine in large-scale screening for congenital cytomegalovirus infection increases inclusion and detection rates. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(2), 206-207.
- Carraro, E., and Granato, C. F. H.** (2003). Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *Journal of Medical Virology*, 70(2), 240-243.
- Caruso, J. L., Childs, J. M., & Howell, D. N.** (2016). Surgical Pathology and Diagnostic Cytology of Viral Infections. In *Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, 151-172.

Centers for Disease Control and Prevention (2020). Laboratory Testing. Acedido a 17 de agosto de 2020 em <https://www.cdc.gov/cmv/clinical/lab-tests.html>.

Chaer, F. E., Shah, D. P., and Chemaly, R. F. (2016). How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(23), 2624-2636.

Chatzakis, C., Ville, Y., Makrydimas, G., Dinas, K., Zavlanos, A., & Sotiriadis, A. (2020). Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.

Chou, S. W., and Scott, K. M. (1988). Rapid quantitation of cytomegalovirus and assay of neutralizing antibody by using monoclonal antibody to the major immediate-early viral protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(3), 504-507.

Coll, O., Benoist, G., Ville, Y., Weisman, L. E., Botet, F., Greenough, A., ... and Carbonell-Estrany, X. (2009). Guidelines on CMV congenital infection. *Journal of Perinatal Medicine*, 37(5), 433-445.

Compton, T., and Freire, A. (2007). Early events in human cytomegalovirus infection. In *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.

Coonrod, D. V., Jack, B. W., Stubblefield, P. G., Hollier, L. M., Boggess, K. A., Cefalo, R., ... and Hogan, V. K. (2008). The clinical content of preconception care: infectious diseases in preconception care. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 199(6), S296-S309.

Cordier, A. G., Guitton, S., Vauloup-Fellous, C., Grangeot-Keros, L., Benachi, A., and Picone, O. (2012). Awareness and knowledge of congenital cytomegalovirus infection among health care providers in France. *Journal of Clinical Virology*, 55(2), 158-163.

Dollard, S. C., Grosse, S. D., and Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 17(5), 355-363.

Dollard, S. C., Schleiss, M. R., & Grosse, S. D. (2010). Public health and laboratory considerations regarding newborn screening for congenital cytomegalovirus. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(2), 249-254.

Dorak, M. T. (2007). *Real-time PCR*. Taylor & Francis.

Drew, W. L. (1988). Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 (Supplement_3), S468-S476.

- Erice, A., Holm, M. A., Gill, P. C., Henry, S., Dirksen, C. L., Dunn, D. L., ... and Balfour, H. H.** (1992). Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11), 2822-2825.
- Erlich, H. A.** (1989). Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*, 9(6), 437-447.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., ... and Smith, T. F.** (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165-256.
- Eventov-Friedman, S., Manor, H., Bar-Oz, B., Averbuch, D., Caplan, O., Lifshitz, A., ... and Wolf, D. G.** (2019). Saliva Real-Time Polymerase Chain Reaction for Targeted Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(11), 1790-1796.
- Exler, S., Daiminger, A., Grothe, M., Schalasta, G., Enders, G., and Enders, M.** (2019). Primary cytomegalovirus (CMV) infection in pregnancy: diagnostic value of CMV PCR in saliva compared to urine at birth. *Journal of Clinical Virology*, 117, 33-36.
- Faqi, A. S., Klug, A., Merker, H. J., and Chahoud, I.** (1997). Ganciclovir induces reproductive hazards in male rats after short-term exposure. *Human & Experimental Toxicology*, 16(9), 505-511.
- Farber, S., and Wolbach, S. B.** (1932). Intranuclear and cytoplasmic inclusions ("protozoan-like bodies") in the salivary glands and other organs of infants. *The American Journal of Pathology*, 8(2), 123.
- Fernandes, C., Marques, A., Chasqueira, M. J., Braz, M. C., Ferreira, A. R., Neto, ... and Paixão, P.** (2020). Saliva pools for screening of human cytomegalovirus using real-time PCR. *European Journal of Pediatrics*, 1-6.
- Fortunato, E. A., McElroy, A. K., Sanchez, V., and Spector, D. H.** (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends in Microbiology*, 8(3), 111-119.
- Fowler, K. B., & Boppana, S. B.** (2018). Congenital cytomegalovirus infection. In *Seminars in perinatology*, 42,(3), 149-154. WB Saunders.
- Gandhi, M. K., and Khanna, R.** (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(12), 725-738.
- Gantt, S., Dionne, F., Kozak, F. K., Goshen, O., Goldfarb, D. M., Park, A. H., ... and Fowler, K.** (2016). Cost-effectiveness of universal and targeted newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA Pediatrics*, 170(12), 1173-1180.

- Gerna, G., Revello, M. G., Percivalle, E., and Morini, F.** (1992). Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1232-1237.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M.** (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.
- Gindes, L., Teperberg-Oikawa, M., Sherman, D., Pardo, J., and Rahav, G.** (2008). Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(7), 830-835.
- Gleaves, C. A., Smith, T. F., Shuster, E. A., and Pearson, G. R.** (1984). Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *Journal of clinical microbiology*, 19(6), 917-919.
- Gleaves, C. A., Smith, T. F., Shuster, E. A., and Pearson, G. R.** (1985). Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(2), 217-221.
- Goderis, J., De Leenheer, E., Smets, K., Van Hoecke, H., Keymeulen, A., and Dhooge, I.** (2014). Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*, 134(5), 972-982.
- Goodpasture, E. W., and Talbot, F. B.** (1921). Concerning the nature of "protozoan-like" cells in certain lesions of infancy. *American Journal of Diseases of Children*, 21(5), 415-425.
- Grangeot-Keros, L., Mayaux, M. J., Lebon, P., Freymuth, F., Eugene, G., Stricker, R., and Dussaix, E.** (1997). Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 944-946.
- Grangeot-Keros, L., and Cointe, D.** (2001). Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *Journal of Clinical Virology*, 21(3), 213-221.
- Griffiths, P. D.** (2009). Cytomegalovirus. In *Principles and practice of clinical virology*. John Wiley & Sons.
- Grosse, S. D., Dollard, S., Ross, D. S., and Cannon, M.** (2009). Newborn screening for congenital cytomegalovirus: options for hospital-based and public health programs. *Journal of Clinical Virology*, 46, S32-S36.

- Guerra, B., Lazzarotto, T., Quarta, S., Lanari, M., Bovicelli, L., Nicolosi, A., and Landini, M. P.** (2000). Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 183(2), 476-482.
- Guerra, B., Simonazzi, G., Puccetti, C., Lanari, M., Farina, A., Lazzarotto, T., and Rizzo, N.** (2008). Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(4), 380-e1.
- Harari, A., Zimmerli, S. C., and Pantaleo, G.** (2004). Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Human Immunology*, 65(5), 500-506.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Heineman, T. C., Schleiss, M., Bernstein, D. I., Spaete, R. R., Yan, L., Duke, G., ... and Kemble, G.** (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1350-1360.
- Hernando, S., Folgueira, L., Lumbreras, C., San Juan, R., Maldonado, S., Prieto, C., ... and Otero, J. R.** (2005). Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplantation Proceedings*, 37(9), 4094-4096.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, 11(9), 1026.
- Hilditch, C., Liersch, B., Spurrier, N., Callander, E. J., Cooper, C., and Keir, A. K.** (2018). Does screening for congenital cytomegalovirus at birth improve longer term hearing outcomes?. *Archives of Disease in Childhood*, 103(10), 988-992.
- Ho, M.** (1991). Cytomegalovirus: biology and infection. Springer Science & Business Media.
- Ho, M.** (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology* 197(2): 65-73
- Hodinka, R. L.** (2015). Human cytomegalovirus. In *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*, 1718-1737. American Society of Microbiology.

- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- Hyde, T. B., Schmid, D. S., & Cannon, M. J.** (2010). Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Reviews in Medical Virology*, 20(5), 311-326.
- Istas, A. S., Demmler, G. J., Dobbins, J. G., and Stewart, J. A.** (1995). Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clinical Infectious Diseases*, 20(3), 665-670.
- Jacquemard, F., Yamamoto, M., Costa, J. M., Romand, S., Jaqz-Aigrain, E., Dejean, A., ... and Ville, Y.** (2007). Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 114(9), 1113-1121.
- Jeon, J., Victor, M., Adler, S. P., Arwady, A., Demmler, G., Fowler, K., ... and Cannon, M. J.** (2006). Knowledge and awareness of congenital cytomegalovirus among women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1-7.
- Johnson, J., Anderson, B., and Pass, R. F.** (2012). Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 55(2), 521.
- Johnson, J., and Anderson, B.** (2014). Screening, prevention, and treatment of congenital cytomegalovirus. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 41(4), 593-599.
- Joseph, A., Mahida, N., Clark, G., Irving, W., and Soo, S.** (2018). Congenital cytomegalovirus infection. *Paediatrics and Child Health*, 28(6), 277-281.
- Kadambari, S., Williams, E. J., Luck, S., Griffiths, P. D., and Sharland, M.** (2011). Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Human Development*, 87(11), 723-728.
- Kadambari, S., Luck, S., Davis, A., Walter, S., Agrup, C., Atkinson, C., ... and Sharland, M.** (2015). Evaluating the feasibility of integrating salivary testing for congenital CMV into the Newborn Hearing Screening Programme in the UK. *European Journal of Pediatrics*, 174(8), 1117-1121.
- Kalejta, R. F.** (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 249-265.
- Kano, Y., and Shiohara, T.** (2000). Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *Journal of Dermatological Science*, 22(3), 196-204.

- Khalil, A., Jones, C., and Ville, Y.** (2017). Congenital cytomegalovirus infection: management update. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(3), 274-280.
- Kim, C. S.** (2010). Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Korean Journal of Pediatrics*, 53(1), 14-20.
- Kim, J., Lim, J., and Lee, C.** (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1358-1373.
- Kimberlin, D. W., Lin, C. Y., Sánchez, P. J., Demmler, G. J., Dankner, W., Shelton, M., ... and Soong, S. J.** (2003). Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *The Journal of Pediatrics*, 143(1), 16-25.
- Kimberlin, D. W., Acosta, E. P., Sánchez, P. J., Sood, S., Agrawal, V., Homans, J., ... and Whitley, R. J.** (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(6), 836-845.
- Kimberlin, D. W., Jester, P. M., Sánchez, P. J., Ahmed, A., Arav-Boger, R., Michaels, M. G., ... and Romero, J. R.** (2015). Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *New England Journal of Medicine*, 372(10), 933-943.
- Korver, A. M. H., De Vries, J. J. C., De Jong, J. W., Dekker, F. W., Vossen, A. C. T. M., and Oudesluys-Murphy, A. M.** (2009). Awareness of congenital cytomegalovirus among doctors in the Netherlands. *Journal of Clinical Virology*, 46, S11-S15.
- Koyano, S., Inoue, N., Nagamori, T., Moriuchi, H., and Azuma, H.** (2013). Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 98(2), F182-F182.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... and Ståhlberg, A.** (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D.** (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*, 98(3), 269-297.
- Lanzieri, T. M., Dollard, S. C., Bialek, S. R., and Grosse, S. D.** (2014). Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *International Journal of Infectious Diseases*, 22, 44-48.

- Lazzarotto, T., Spezzacatena, P., Pradelli, P., Abate, D. A., Varani, S., and Landini, M. P.** (1997). Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(4), 469-473.
- Lazzarotto, T., Varani, S., Guerra, B., Nicolosi, A., Lanari, M., and Landini, M. P.** (2000a). Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics*, 137(1), 90-95.
- Lazzarotto, T., Varani, S., Spezzacatena, P., Gabrielli, L., Pradelli, P., Guerra, B., and Landini, M. P.** (2000b). Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunology*, 13(1), 137-141.
- Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Lanari, M., Guerra, B., Bellucci, T., Sassi, M., & Landini, M. P.** (2004). Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Human immunology*, 65(5), 410-415.
- Lazzarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L., and Landini, M. P.** (2008). New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 41(3), 192-197.
- Lazzarotto, T.** (2010). The best practices for screening, monitoring, and diagnosis of cytomegalovirus disease, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*, 32(2), 9-15.
- Lazzarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, M., and Landini, M. P.** (2011). Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1285-1293.
- Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Guerra, B., Cervi, F., Piccirilli, G., Simonazzi, G., ... and Landini, M. P.** (2014). Diagnosis and prognosis of congenital CMV infection: a case report and review of the literature. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(sup244), 34-40.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., and Kim, Y. H.** (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Leruez-Ville, M., Ghout, I., Bussi eres, L., Stirnemann, J., Magny, J. F., Couderc, S., ... and Winer, N.** (2016). In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(4), 462-e1.
- Leruez-Ville, M., and Ville, Y.** (2017). Fetal cytomegalovirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 38, 97-107.

- Lim, Y., and Lyall, H.** (2017). Congenital cytomegalovirus—who, when, what-with and why to treat?. *Journal of Infection*, 74, S89-S94.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K.** (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
- Lopo, S., Palminha, P., Pité, M., Caçador, T., Vinagre, E., Pereira, M. A., ... and Machado, M. C.** (2004). Infecção Congénita pelo vírus citomegálico - Resultados preliminares de estudo prospectivo. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 14: 14-21.
- Lopo, S., Vinagre, E., Palminha, P., Paixão, M. T., Nogueira, P., and Freitas, M. G.** (2011). Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Eurosurveillance*, 16(25), 1-6.
- Luck, S. E., Wieringa, J. W., Blázquez-Gamero, D., Henneke, P., Schuster, K., Butler, K., ... and Heath, P.** (2017). Congenital Cytomegalovirus: a European expert consensus statement on diagnosis and management. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(12), 1205-1213.
- Lunardi, S., Lorenzoni, F., and Ghirri, P.** (2019). Universal Screening for Congenital CMV Infection. In *Common Newborn and Infant Health Problems*. IntechOpen.
- Mace, M., Sissoeff, L., Rudent, A., and Grangeot-Keros, L.** (2004). A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenatal Diagnosis*, 24(11), 861-863.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., and Nitsche, A.** (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292-1305.
- Mackay, I. M.** (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190-212.
- Malm, G., and Engman, M. L.** (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 12(3), 154-159.
- Marsico, C., and Kimberlin, D. W.** (2017). Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Italian Journal of Pediatrics*, 43(1), 38.
- Mocarski, E. S., Shenk, T., Griffiths, P. D., and Pass, R. F.** (2013). Cytomegaloviruses. *Fields Virology*, 1960-2014. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mullis, K. B.** (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- Nagano, N., and Morioka, I.** (2020). Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology, prediction, diagnosis, and emerging treatment options for symptomatic infants. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 8(1), 1-9.
- Nangle, S., Mitra, S., Roskos, S., and Havlichek, D.** (2018). Cytomegalovirus infection in immunocompetent adults: Is observation still the best strategy?. *IDCases*, 14, e00442.
- Nassetta, L., Kimberlin, D., and Whitley, R.** (2009). Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(5), 862-867.
- Nicloux, M., Peterman, L., Parodi, M., and Magny, J. F.** (2020). Outcome and management of newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Archives de Pédiatrie*, 27, 160-165.
- Nigro, G., Anceschi, M. M., Cosmi, E. V., Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group, and names of collaborators may be found on page 576.** (2003). Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 110(6), 572-577.
- Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., and Best, A. M.** (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 353(13), 1350-1362.
- Nigro, G., Capretti, I., Manganello, A. M., Best, A. M., and Adler, S. P.** (2015). Primary maternal cytomegalovirus infections during pregnancy: association of CMV hyperimmune globulin with gestational age at birth and birth weight. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 28(2), 168-171.
- Niubò, J., Pérez, J., Martínez-Lacasa, J. T., García, A., Roca, J., Fabregat, J., ... and Martín, R.** (1996). Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 24(1), 19-24.
- Nyholm, J. L., and Schleiss, M. R.** (2010). Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *International Journal of Women's Health*, 2, 23.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., ... and Sata, T.** (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *Journal of Virology*, 77(15), 8541-8547.

- Oliver, S. E., Cloud, G. A., Sánchez, P. J., Demmler, G. J., Dankner, W., Shelton, M., ... and Whitley, R. J.** (2009). Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *Journal of Clinical Virology*, 46, S22-S26.
- Ornoy, A., and Diav-Citrin, O.** (2006). Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reproductive Toxicology*, 21(4), 399-409.
- Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Binda, S., Caroppo, S., and Barbi, M.** (2005). Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *Journal of Virological Methods*, 128(1-2), 1-5.
- Paixão, P.** (2009). Contributo para o estudo da infecção congénita pelo Vírus Citomegálico em Portugal. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa.
- Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Vilarinho, L., and Osório, R. V.** (2009). Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Eurosurveillance*, 14(9), 19135.
- Paixão, P., Almeida, S., Videira, P. A., Ligeiro, D., and Marques, T.** (2012). Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. *European Journal of Pediatrics*, 171(1), 125-129.
- Pass, R. F., Duliege, A. M., Boppana, S., Sekulovich, R., Percell, S., Britt, W., and Burke, R. L.** (1999). A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(4), 970-975.
- Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J., and Stagno, S.** (2006). Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 216-220.
- Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M. L., ... and Cloud, G.** (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 360(12), 1191-1199.
- Paya, C. V., Wold, A. D., and Smith, T. F.** (1987). Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(5), 755-757.
- Pereboom, M. T., Manniën, J., Spelten, E. R., Hutton, E. K., and Schellevis, F. G.** (2014). Maternal cytomegalovirus infection prevention: the role of Dutch primary care midwives. *Midwifery*, 30(12), 1196-1201.

- Picone, O., Simon, I., Benachi, A., Brunelle, F., and Sonigo, P.** (2008). Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenatal Diagnosis*, 28(8), 753-758.
- Pignatelli, S., Monte, P. D., Rossini, G., and Landini, M. P.** (2004). Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews in Medical Virology*, 14(6), 383-410.
- Poncet, D., Pauleau, A. L., Szabadkai, G., Voza, A., Scholz, S. R., Le Bras, M., ... and Hahn, G.** (2006). Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *The Journal of Cell Biology*, 174(7), 985-996.
- Porter-Jordan, K., Rosenberg, E. I., Keiser, J. F., Gross, J. D., Ross, A. M., Nasim, S., and Garrett, C. T.** (1990). Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *Journal of Medical Virology*, 30(2), 85-91.
- Rawlinson, W. D.** (1999). Broadsheet number 50: diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease. *Pathology*, 31(2), 109-115.
- Rawlinson, W. D., Hamilton, S. T., and van Zuylen, W. J.** (2016). Update on treatment of cytomegalovirus infection in pregnancy and of the newborn with congenital cytomegalovirus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(6), 615-624.
- Rawlinson, W. D., Boppana, S. B., Fowler, K. B., Kimberlin, D. W., Lazzarotto, T., Alain, S., ... and Greenlee, J.** (2017). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), e177-e188.
- Razonable, R. R., Paya, C. V., and Smith, T. F.** (2002). Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 746-752.
- Revello, M. G., and Gerna, G.** (2002). Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 680-715.
- Revello, M. G., and Gerna, G.** (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 29(2), 71-83.
- Revello, M. G., Gorini, G., and Gerna, G.** (2004). Clinical evaluation of a chemiluminescence immunoassay for determination of immunoglobulin G avidity to human cytomegalovirus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4), 801-805.

- Revello, M. G., Lazzarotto, T., Guerra, B., Spinillo, A., Ferrazzi, E., Kustermann, A., ... and Arossa, A.** (2014). A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *New England Journal of Medicine*, 370(14), 1316-1326.
- Revello, M. G., Tibaldi, C., Masuelli, G., Frisina, V., Sacchi, A., Furione, M., ... and Gerna, G.** (2015). Prevention of primary cytomegalovirus infection in pregnancy. *EBioMedicine*, 2(9), 1205-1210.
- Ronchi, A., Pugni, L., and Mosca, F.** (2018). Cytomegalovirus Infection. In *Neonatal Infections*, 83-93.
- Ross, S. A., and Boppana, S. B.** (2005). Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 16(1), 44-49.
- Ross, D. S., Victor, M., Sumartojo, E., and Cannon, M. J.** (2008). Women's knowledge of congenital cytomegalovirus: results from the 2005 HealthStyles™ survey. *Journal of Women's Health*, 17(5), 849-858.
- Ross, S. A., Novak, Z., Pati, S., and Boppana, S. B.** (2011). Diagnosis of cytomegalovirus infections. *Infectious Disorders Drug Targets*, 11(5), 466.
- Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Bernstein, D. I., ... and Boppana, S. B.** (2014). Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(9), 1415-1418.
- Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Stewart, A., ... and Boppana, S. B.** (2015). Urine collection method for the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(8), 903.
- Rowan, C., Judge, C., Cannon, M. D., Cullen, G., Mulcahy, H. E., Ryan, E., ... and Doherty, G. A.** (2018). Severe symptomatic primary CMV infection in inflammatory bowel disease patients with low population seroprevalence. *Gastroenterology Research and Practice*, 18, 1-6.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S. Turner, H. C. and Huebner, R. J.** (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(2), 418-424.
- Rowshani, A. T., Bemelman, F. J., van Leeuwen, E. M., van Lier, R. A., & ten Berge, I. J.** (2005). Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 79(4), 381-386.

- Sabbaj, S., Pass, R. F., Pichon, S., and Goepfert, P. A.** (2011). Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *Journal of Infectious Diseases*, 203(11), 1534-1541.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Shahar-Nissan, K., Pardo, J., Peled, O., Krause, I., Bilavsky, E., Wiznitzer, A., ... & Amir, J.** (2020). Valaciclovir to prevent vertical transmission of cytomegalovirus after maternal primary infection during pregnancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 396(10253), 779-785.
- Sheehan, D., & Tyther, R.** (2009). *Two-dimensional electrophoresis protocols*. Humana Press.
- Shipley, G. L.** (2006). An introduction to real-time PCR. *Real-time PCR*, 1, 1-37.
- Sia, I. G., and Patel, R.** (2000). New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 83-121.
- Sinclair, J., and Sissons, P.** (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 87(7), 1763-1779.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., and Jahn, G.** (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology*, 76(4), 741-750.
- Smith, M. G.** (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(2), 424-430.
- Smith, C. J., and Osborn, A. M.** (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20.
- Spong, C. Y., and Thom, E.** (2012). A randomized trial to prevent congenital cytomegalovirus (CMV). NIH Clinical trials. (Clinicaltrials.gov Identifier NCT01376778) [<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01376778>, acedido a 24 de novembro de 2019]
- Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E., and Alford, C. A.** (1982). Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 25(3), 563-576.
- Stagno, S., and Whitley, R. J.** (1985). Herpesvirus Infections of Pregnancy: Cytomegalovirus and Epstein–Barr Virus Infections. *New England Journal of Medicine*, 313(20), 1270-1274.

- Stehel, E. K., and Sánchez, P. J.** (2005). Cytomegalovirus infection in the fetus and neonate. *NeoReviews*, 6(1), e38-e45.
- Tastad, K. J., Schleiss, M. R., Lammert, S. M., and Basta, N. E.** (2019). Awareness of congenital cytomegalovirus and acceptance of maternal and newborn screening. *PloS One*, 14(8).
- The, T. H., Van Der Bij, W., Van Den Berg, A. P., Van der Giessen, M., Weits, J., Sprenger, H. G., and Van Son, W. J.** (1990). Cytomegalovirus antigenemia. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(Supplement_7), S737-S744.
- Van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., Van Son, W. J., and Tegzess, A. M.** (1988). Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12), 2531-2535.
- Van der Ploeg, M., Van den Berg, A. P., Vlieger, A. M., Van der Giessen, M., and Van Son, W. J.** (1992). Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes-a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*, 54(2), 193-198.
- van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., and Hays, J. P.** (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*, 161-197. Springer Science & Business Media.
- van Zuylen, W. J., Hamilton, S. T., Naing, Z., Hall, B., Shand, A., and Rawlinson, W. D.** (2014). Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstetric medicine*, 7(4), 140-146.
- Varani, S., and Landini, M. P.** (2011). Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*, 2(1), 6.
- Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A. G., Parent-du-Châtelet, I., Senat, M. V., Frydman, R., and Grangeot-Keros, L.** (2009). Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy?: Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *Journal of Clinical Virology*, 46, S49-S53.
- Vide Tavares, M., Domingues, A. P., Tavares, M., Malheiro, E., Tavares, F., and Moura, P.** (2011). Citomegalovírus: existe lugar para o rastreio durante a gravidez. *Acta Médica Portuguesa*, 24 (Suppl 4), 1003-1008.
- Visentin, S., Manara, R., Milanese, L., Da Roit, A., Forner, G., Salviato, E., ... and Cusinato, R.** (2012). Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clinical Infectious Diseases*, 55(4), 497-503.

- Vonglahn, W. C., and Pappenheimer, A. M.** (1925). Intranuclear Inclusions in Visceral Disease. *The American Journal of Pathology*, 1(5), 445–466.3.
- Wakefield, J. C.** (1992). The concept of mental disorder: on the boundary between biological facts and social values. *American Psychologist*, 47(3), 373.
- Walker, N. J.** (2001). Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(3), 121-127.
- Walker, S. P., Palma-Dias, R., Wood, E. M., Shekleton, P., and Giles, M. L.** (2013). Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 13(1), 96.
- Waters, A., Jennings, K., Fitzpatrick, E., Coughlan, S., Molloy, E. J., De Gascun, C. F., ... and Knowles, S. J.** (2014). Incidence of congenital cytomegalovirus infection in Ireland: implications for screening and diagnosis. *Journal of Clinical Virology*, 59(3), 156-160.
- Weller, T. H., Macauley, J. C., Craig, J. M., and Wirth, P.** (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94(1), 4-12.
- Weller, T. H., Hanshaw, J. B., and Scott, D. E.** (1960). Serologic Differentiation of Viruses responsible for Cytomegalic Inclusion Disease. *Virology*, 12(1), 130-32.
- Whitley, R. J.** (2012). The use of antiviral drugs during the neonatal period. *Clinics in perinatology*, 39(1), 69-81.
- Willame, A., Blanchard-Rohner, G., Combescure, C., Irion, O., Posfay-Barbe, K., and Martinez de Tejada, B.** (2015). Awareness of cytomegalovirus infection among pregnant women in Geneva, Switzerland: a cross-sectional study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(12), 15285-15297.
- Willey, J. M., Sherwood, L., and Woolverton, C. J.** (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology, pp. 361-366.
- Williams, E. J., Gray, J., Luck, S., Atkinson, C., Embleton, N. D., Kadambari, S., ... and Clark, J. E.** (2015). First estimates of the potential cost and cost saving of protecting childhood hearing from damage caused by congenital CMV infection. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 100(6), F501-F506.
- Wilson, J. M. G., Jungner, G., and World Health Organization.** (1968). Principles and practice of screening for disease.

- Wilton, L. V., Pearce, G. L., Martin, R. M., Mackay, F. J., and Mann, R. D.** (1998). The outcomes of pregnancy in women exposed to newly marketed drugs in general practice in England. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 105(8), 882-889.
- Wizman, S., Lamarre, V., Coic, L., Kakkar, F., Le Meur, J. B., Rousseau, C., ... and Tapiero, B.** (2016). Awareness of cytomegalovirus and risk factors for susceptibility among pregnant women, in Montreal, Canada. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16(1), 54.
- Wong, M. L., and Medrano, J. F.** (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Wyatt, J. P., Saxton, J., Lee, R. S., and Pinkerton, H.** (1950). Generalized cytomegalic inclusion disease. *Journal of Pediatrics*, 36(3), 271-94.
- Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., Marin, L. J., Brito, R. M., Oliveira, P. F. C., and Coelho, T. B.** (2006). Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection?. *Journal of Clinical Virology*, 36(3), 228-230.
- Yan, S. S., and Fedorko, D. P.** (2002). Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2(3), 155-167.
- Yilmaz, M., Ozic, C., & Gok, I.** (2012). Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis—Principles and Basics*, pp. 33-40.
- Yinon, Y., Farine, D., and Yudin, M. H.** (2010). Screening, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 65(11), 736-743.
- Yu, X., Shah, S., Lee, M., Dai, W., Lo, P., Britt, W., ... & Zhou, Z. H.** (2011). Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *Journal of Structural Biology*, 174(3), 451-460.
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C. N.** (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 85.

Anexo I – Autorização da Comissão de Ética da NMS|FCM – UNL (CEFCM) para a realização do estudo.



Decisão final sobre o projecto "Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva"

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar o projecto de investigação intitulado "*Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva*" (nº15/2019/CEFCM), submetido por Prof. Doutor Paulo Paixão.

Lisboa, 10 de Julho de 2019

O Presidente da Comissão de Ética,

(Prof. Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously approved the Project entitled "*Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva*" (nr.15/2019/CEFCM), submitted by Paulo Paixão, MD, PhD.

Lisbon, July 10th, 2019

The Chairman of the Ethics Research Committee,

(Diogo Pais, MD, PhD)

Anexo II – Autorização da Comissão de Ética para a Saúde do CHLO para a realização do estudo.



Exma. Senhora,
Dra. Ana Teresa Maria
Unidade de Neonatologia – Serviço de Pediatria do CHLO
Hospital de São Francisco Xavier
Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, E.P.E.

Exmo. Senhor,
Prof.º Doutor Paulo Paixão
Unidade de Infecção – *etiologia, patogénese e bases terapêuticas*
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade NOVA de Lisboa

Nossa referência
281/CES – 2018

Data
14-11-2018

Nº Páginas
2 (incluindo esta)

Nº Anexos
1

Assunto: Parecer favorável ao estudo “**Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva**”

Como cedeu Prof. Paulo Paixão

Exmos. Senhores,

Após reunião de 05 de novembro de 2018 e estando atualmente o estudo de acordo com as normas de submissão impostas por esta CES, informo que segue em anexo o **parecer favorável**.

Com os melhores cumprimentos, *de SNS*

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde

Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques
MARIA TERESA MARQUES
Presidente da Comissão
de Ética para a Saúde



Comissão de Ética para a Saúde (CES) do CHLO
Hospital de Egas Moniz | Rua da Junqueira, 126 - 1349-019 Lisboa
Telefone: 210 432 665 | Correio eletrónico: anavalho@chlo.min-saude.pt

**Anexo II – Autorização da Comissão de Ética para a Saúde do CHLO para a realização do estudo -
Continuação.**



Comissão de Ética para a Saúde

N.º Registo no RNEC: 20170700050

PARECER

Estudo,

Título: “**Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva**”

Investigadora Principal no CHLO: **Dra. Ana Teresa Maria** (Unidade de Neonatologia – Serviço de Pediatria do CHLO – HSFX)

Investigador Principal, externo ao CHLO: **Prof.º Doutor Paulo Paixão** (Unidade de Infeção – etiologia, patogénese e bases terapêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade NOVA de Lisboa)

Serviços onde decorrerá o estudo: **Unidade de Neonatologia do Serviço de Pediatria do HSFX – CHLO e Unidade de Infeção – etiologia, patogénese e bases terapêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade NOVA de Lisboa**

Após reunião de 05 de novembro de 2018 e no seguimento da receção do modelo de Consentimento Informado retificado, assim como de outros esclarecimentos, estando o estudo de acordo com as normas de submissão impostas por esta CES, deliberou-se emitir **parecer favorável** à realização do mesmo.

A Comissão de Ética para a Saúde solicita aos Investigadores Principais que, quando da conclusão deste estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados e conclusões do mesmo.

Ouvido o Relator, o processo foi votado pelos Membros da Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental presentes em reunião de 05 de novembro de 2018:

Presidente: Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

Dr. Carlos Costa, Enf.ª Clara Carvalho, Dra. Paula Peixe,

Dr. José Santana Carlos, Dr. Rui Campante Teles e Padre João Valente

Pelo exposto, emitiu-se a 14 de novembro de 2018, **parecer favorável**.

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde

Prof.ª Doutora Maria Teresa Marques

MARIA TERESA MARQUES
Presidente da Comissão
de Ética para a Saúde

Comissão de Ética para a Saúde (CES) do CHLO
Hospital de Egas Moniz | Rua da Junqueira, 126 - 1349-019 Lisboa
Telefone: 210 432 665 | Correio eletrónico: anavalho@chlo.min-saude.pt

Anexo III – Consentimento informado entregue aos representantes legais das crianças que participaram no estudo.



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva

FOLHA DE INFORMAÇÃO

O citomegalovírus humano (CMV) é o agente mais comum de infeção congénita. O método de referência para o diagnóstico de infeção congénita por CMV é a pesquisa de CMV na urina colhida durante as primeiras 2 semanas de vida. No entanto, a colheita de urina no recém-nascido, através de saco coletor, é demorada e pouco prática, pelo que a saliva tem vindo progressivamente a substituir a urina como amostra preferencial, dada a facilidade de colheita da amostra de saliva através de uma zaragatoa oral e ao fato de ter uma sensibilidade equivalente à da urina. No entanto, que seja do nosso conhecimento, no nosso país nunca foi realizado um estudo de validação da pesquisa do vírus na saliva. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo a validação desta pesquisa para o diagnóstico e rastreio desta infeção congénita.

A participação consistirá apenas na recolha, com uma zaragatoa, de uma pequena quantidade de saliva, pelo que não envolve qualquer tipo de risco para a criança.

Se assim o desejarem, poderão desistir do estudo a qualquer momento.

Médico responsável: Dra Madalena Tuna (Cédula Profissional 34721)

(Contato: 210431473)

Encarregado da Proteção de Dados (DPO-Data Protection Officer) do CHLO: Dra. Ana Luísa Caetano

(Contacto, email: alcaetano@chlo.min-saude.pt)

Hospital de São Francisco Xavier - Estrada do Porto do Alto do Duque, 1449-005 Lisboa - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 043 15 89

Hospital de Egas Moniz - Rua da Junqueira, 126, 1349-019 Lisboa - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 043 24 30

Hospital de Santa Cruz - Rua Prof. Dr. Reinaldo dos Santos, 2790-134 Cascais - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 418 80 95

Anexo III – Consentimento informado entregue aos representantes legais das crianças que participaram no estudo - Continuação.



REPÚBLICA
PORTUGUESA
SAÚDE



SNS SERVIÇO NACIONAL
DE SAÚDE



CENTRO HOSPITALAR DE
LISBOA OCIDENTAL, E.P.E.

Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva

PROTOCOLO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu abaixo assinado (nome completo)

..... pai/mãe ou representante legal de (identificação completa da criança) nascido a / /
declaro que autorizo a recolha de amostras de saliva ao meu filho, com o objetivo de participar num estudo sobre o "Diagnóstico da infeção congénita por CMV recorrendo a *pools* de saliva".

Fui informado que posso desistir do processo sempre que for essa a minha decisão, sem que daí resulte qualquer repercussão sobre o meu seguimento, ou do meu filho, nas consultas do Hospital S. Francisco Xavier.

Os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos do Projecto de Investigação e ser objeto de publicação, mas os dados de carácter pessoal serão sempre considerados estritamente confidenciais.

Lisboa / /

Assinatura do pai/mãe ou representante legal da criança:

.....
Assinatura do médico responsável:

..... Cédula Profissional nº

Este documento deve ser presente e assinado em duplicado, devendo um exemplar ficar na posse do doente ou representante legal

Hospital de São Francisco Xavier - Entrada do Porto do Alto do Duque, 1449-005 Lisboa - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 043 15 89

Hospital de Egas Moniz - Rua da Junqueira, 126, 1349-019 Lisboa - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 043 24 30

Hospital de Santa Cruz - Rua Prof. Dr. Rainaldos dos Santos, 2790-134 Cascais - Telef.: 21 043 10 00 - Fax: 21 418 80 95

Anexo IV – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente dos RN (Unidade de Neonatologia – Serviço de Pediatria - HSFx).

Amostra	CT		Resultado
TD1	Ind.	Ind.	Negativo
TD2	Ind.	Ind.	Negativo
TD3	Ind.	Ind.	Negativo
TD4	Ind.	Ind.	Negativo
TD5	Ind.	Ind.	Negativo
TD6	Ind.	Ind.	Negativo
TD7	Ind.	Ind.	Negativo
TD8	Ind.	Ind.	Negativo
TD9	Ind.	Ind.	Negativo
TD10	Ind.	Ind.	Negativo
TD11	Ind.	Ind.	Negativo
TD12	Ind.	Ind.	Negativo
TD13	Ind.	Ind.	Negativo
TD14	Ind.	Ind.	Negativo
TD15	Ind.	Ind.	Negativo
TD16	Ind.	Ind.	Negativo
TD17	Ind.	Ind.	Negativo
TD18	Ind.	Ind.	Negativo
TD19	Ind.	Ind.	Negativo
TD20	Ind.	Ind.	Negativo
TD21	Ind.	Ind.	Negativo
TD22	Ind.	Ind.	Negativo
TD23	Ind.	Ind.	Negativo
TD24	Ind.	Ind.	Negativo
TD25	Ind.	Ind.	Negativo
TD26	Ind.	Ind.	Negativo
TD27	Ind.	Ind.	Negativo
TD28	Ind.	Ind.	Negativo
TD29	39,54	Ind.	Negativo
TD30	Ind.	Ind.	Negativo
TD31	Ind.	Ind.	Negativo
TD32	Ind.	Ind.	Negativo
TD33	Ind.	Ind.	Negativo
TD34	Ind.	Ind.	Negativo
TD35	Ind.	Ind.	Negativo
TD36	Ind.	Ind.	Negativo
TD37	Ind.	Ind.	Negativo
TD67	Ind.	Ind.	Negativo
TD68	Ind.	Ind.	Negativo
TD69	Ind.	Ind.	Negativo
TD70	Ind.	Ind.	Negativo
TD71	Ind.	Ind.	Negativo

Amostra	CT		Resultado
TD72	Ind.	Ind.	Negativo
TD73	Ind.	Ind.	Negativo
TD74	Ind.	Ind.	Negativo
TD75	Ind.	Ind.	Negativo
TD76	Ind.	Ind.	Negativo
TD77	Ind.	Ind.	Negativo
TD78	Ind.	Ind.	Negativo
TD79	Ind.	Ind.	Negativo
TD80	Ind.	Ind.	Negativo
TD81	Ind.	Ind.	Negativo
TD82	Ind.	Ind.	Negativo
TD83	Ind.	Ind.	Negativo
TD84	Ind.	Ind.	Negativo
TD85	Ind.	Ind.	Negativo
TD86	Ind.	Ind.	Negativo
TD87	Ind.	Ind.	Negativo
TD88	Ind.	Ind.	Negativo
TD89	Ind.	Ind.	Negativo
TD90	Ind.	Ind.	Negativo
TD91	Ind.	Ind.	Negativo
TD92	Ind.	Ind.	Negativo
TD93	Ind.	Ind.	Negativo
TD94	Ind.	Ind.	Negativo
TD95	Ind.	Ind.	Negativo
TD96	Ind.	Ind.	Negativo
TD97	Ind.	Ind.	Negativo
TD98	Ind.	Ind.	Negativo
TD99	Ind.	Ind.	Negativo
TD100	Ind.	Ind.	Negativo
TD140	Ind.	Ind.	Negativo
TD141	Ind.	Ind.	Negativo
TD142	Ind.	Ind.	Negativo
TD143	Ind.	Ind.	Negativo
TD144	Ind.	Ind.	Negativo
TD145	Ind.	Ind.	Negativo
TD146	Ind.	Ind.	Negativo
TD147	Ind.	Ind.	Negativo
TD148	Ind.	Ind.	Negativo
TD149	33,27	32,62	Positivo
TD150	Ind.	Ind.	Negativo
TD151	Ind.	Ind.	Negativo
TD152	Ind.	Ind.	Negativo

Anexo IV – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente dos RN (Unidade de Neonatologia – Serviço de Pediatria - HSFx) - Continuação.

Amostra	CT		Resultado
TD153	39,35	Ind.	Negativo
TD154	Ind.	Ind.	Negativo
TD155	Ind.	Ind.	Negativo
TD156	Ind.	Ind.	Negativo
TD157	Ind.	Ind.	Negativo
TD158	Ind.	Ind.	Negativo
TD159	Ind.	Ind.	Negativo
TD160	Ind.	Ind.	Negativo
TD161	Ind.	Ind.	Negativo
TD162	Ind.	Ind.	Negativo
TD163	Ind.	Ind.	Negativo
TD164	Ind.	Ind.	Negativo
TD165	Ind.	Ind.	Negativo
TD166	Ind.	Ind.	Negativo
TD174	Ind.	Ind.	Negativo
TD175	Ind.	Ind.	Negativo
TD176	Ind.	Ind.	Negativo
TD177	Ind.	Ind.	Negativo
TD178	Ind.	Ind.	Negativo
TD179	Ind.	Ind.	Negativo
TD180	Ind.	Ind.	Negativo
TD181	Ind.	Ind.	Negativo
TD182	Ind.	Ind.	Negativo
TD183	Ind.	Ind.	Negativo
TD184	Ind.	Ind.	Negativo
TD185	39,18	Ind.	Negativo
TD186	Ind.	Ind.	Negativo
TD187	Ind.	Ind.	Negativo
TD188	Ind.	Ind.	Negativo
TD189	Ind.	Ind.	Negativo
TD190	Ind.	Ind.	Negativo
TD191	Ind.	Ind.	Negativo
TD192	Ind.	Ind.	Negativo
TD193	Ind.	Ind.	Negativo
TD194	Ind.	Ind.	Negativo
TD195	Ind.	Ind.	Negativo
TD196	Ind.	Ind.	Negativo
TD197	Ind.	Ind.	Negativo
TD198	Ind.	Ind.	Negativo
TD199	Ind.	Ind.	Negativo
TD200	Ind.	Ind.	Negativo
TD201	Ind.	Ind.	Negativo

Amostra	CT		Resultado
TD202	Ind.	Ind.	Negativo
TD203	Ind.	Ind.	Negativo
TD204	Ind.	Ind.	Negativo
TD205	Ind.	Ind.	Negativo
TD206	Ind.	Ind.	Negativo
TD207	Ind.	Ind.	Negativo
TD208	Ind.	Ind.	Negativo
TD209	Ind.	Ind.	Negativo
TD210	Ind.	Ind.	Negativo
TD211	Ind.	Ind.	Negativo
TD212	Ind.	Ind.	Negativo
TD213	Ind.	Ind.	Negativo
TD214	Ind.	Ind.	Negativo

Legenda:

* - Amostras Excluídas do Estudo

Ind. - Indeterminado

Anexo V – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente das CR (Urgência – Serviço de Pediatria - HSFx).

Amostra	CT		Resultado
TD38	Ind.	Ind.	Negativo
TD39	37,83	37,85	Positivo
TD40	Ind.	Ind.	Negativo
TD41	Ind.	Ind.	Negativo
TD42	Ind.	Ind.	Negativo
TD43	Ind.	Ind.	Negativo
TD44	Ind.	Ind.	Negativo
TD45	Ind.	Ind.	Negativo
TD46	Ind.	Ind.	Negativo
TD47	34,94	35,29	Positivo
TD48	Ind.	Ind.	Negativo
TD49	Ind.	Ind.	Negativo
TD50	Ind.	Ind.	Negativo
TD51	Ind.	Ind.	Negativo
TD52	Ind.	Ind.	Negativo
TD53	Ind.	Ind.	Negativo
TD54	Ind.	Ind.	Negativo
TD55	Ind.	Ind.	Negativo
TD56	Ind.	Ind.	Negativo
TD57	36,67	37,15	Positivo
TD58	38,41	Ind.	Negativo
TD59	Ind.	Ind.	Negativo
TD60	36,86	37,73	Positivo
TD61*	38,45	37,27	Positivo
TD62	39,69	Ind.	Negativo
TD63	32,88	32,76	Positivo
TD64	Ind.	Ind.	Negativo
TD65	30,01	30,07	Positivo
TD66*	36,31	36,82	Positivo
TD101	Ind.	Ind.	Negativo
TD102	Ind.	Ind.	Negativo
TD103	Ind.	Ind.	Negativo
TD104	Ind.	Ind.	Negativo
TD105	Ind.	Ind.	Negativo
TD106	Ind.	Ind.	Negativo
TD107	Ind.	Ind.	Negativo
TD108	Ind.	Ind.	Negativo
TD109	Ind.	Ind.	Negativo
TD110	Ind.	Ind.	Negativo
TD111	Ind.	Ind.	Negativo
TD112	Ind.	Ind.	Negativo
TD113	Ind.	Ind.	Negativo

Amostra	CT		Resultado
TD114	Ind.	Ind.	Negativo
TD115	Ind.	Ind.	Negativo
TD116	Ind.	Ind.	Negativo
TD117	Ind.	Ind.	Negativo
TD118	25,26	25,14	Positivo
TD119	Ind.	Ind.	Negativo
TD120	Ind.	Ind.	Negativo
TD121	Ind.	Ind.	Negativo
TD122	Ind.	Ind.	Negativo
TD123	Ind.	Ind.	Negativo
TD124	Ind.	Ind.	Negativo
TD125	Ind.	Ind.	Negativo
TD126	Ind.	Ind.	Negativo
TD127	Ind.	Ind.	Negativo
TD128	Ind.	Ind.	Negativo
TD129	34,03	33,50	Positivo
TD130	Ind.	Ind.	Negativo
TD131	Ind.	Ind.	Negativo
TD132	Ind.	Ind.	Negativo
TD133	Ind.	Ind.	Negativo
TD134	Ind.	Ind.	Negativo
TD135	Ind.	Ind.	Negativo
TD136	Ind.	Ind.	Negativo
TD137	Ind.	Ind.	Negativo
TD138	Ind.	Ind.	Negativo
TD139	Ind.	Ind.	Negativo
TD167	Ind.	Ind.	Negativo
TD168	Ind.	Ind.	Negativo
TD169	Ind.	Ind.	Negativo
TD170	Ind.	Ind.	Negativo
TD171	Ind.	Ind.	Negativo
TD172	39,02	Ind.	Negativo
TD173	Ind.	Ind.	Negativo
TD215	38,11	Ind.	Negativo
TD216	Ind.	Ind.	Negativo
TD217	31,18	31,21	Positivo
TD218	Ind.	Ind.	Negativo
TD219	Ind.	Ind.	Negativo
TD220	Ind.	Ind.	Negativo
TD221	36,66	36,15	Positivo
TD222	Ind.	Ind.	Negativo
TD223	Ind.	Ind.	Negativo

Anexo V – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente das CR (Urgência – Serviço de Pediatria - HSFX) - Continuação.

Amostra	CT		Resultado
TD224	Ind.	Ind.	Negativo
TD225	Ind.	Ind.	Negativo
TD226	Ind.	Ind.	Negativo

Legenda:

* - Amostras Excluídas do Estudo

Ind. - Indeterminado

Anexo VI – Resultados obtidos na PCR-RT qualitativa (CTs) nas amostras de saliva testadas individualmente dos RN (Amostras armazenadas no laboratório).

Amostra	CT		Resultado
CMV12A	30,55	30,50	Positivo
CMV57A	17,56	17,75	Positivo
CMV82	19,99	20,00	Positivo
CMV103A	28,22	28,01	Positivo
CMV190A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV199A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV224	Ind.	Ind.	Negativo
CMV225	Ind.	Ind.	Negativo
CMV226	Ind.	Ind.	Negativo
CMV227	Ind.	Ind.	Negativo
CMV228	Ind.	Ind.	Negativo
CMV229	Ind.	Ind.	Negativo
CMV230	Ind.	Ind.	Negativo
CMV231	38,45	Ind.	Negativo
CMV231A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV239A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV245A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV246A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV247A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV248A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV249A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV250A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV251A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV252A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV253A	Ind.	Ind.	Negativo
CMV253	23,99	23,99	Positivo
CMV305A	27,52	27,36	Positivo
CMV307A	22,90	22,75	Positivo
CMV422A	27,07	26,85	Positivo
CMV481A	31,08	30,26	Positivo
CMV566A	24,04	24,29	Positivo
CMV663	28,51	28,54	Positivo

Legenda:

* - Amostras Excluídas do Estudo

Ind. - Indeterminado